



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

PERFIS DE CONCENTRAÇÕES ELEMENTARES EM DENTES CARIADOS

Trabalho submetido por
Leandro Jorge Ponte Morgado
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2015



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

PERFIS DE CONCENTRAÇÕES ELEMENTARES EM DENTES CARIADOS

Trabalho submetido por
Leandro Jorge Ponte Morgado
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. José Silva Marques

setembro de 2015

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor José Silva Marques, por toda a disponibilidade e empenho demonstrados no decorrer deste trabalho.

Aos meus pais, por me terem educado e transmitido todos os valores e lições de vida que me tornaram na pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos pelo apoio incondicional que sempre recebi ao longo deste percurso.

A toda a restante família pela simples presença na minha vida.

À Luísa pelo constante amor, força e carinho que ao longo destes anos me deu.

Aos meus amigos, por todos os obstáculos que me ajudaram a ultrapassar.

Resumo

Introdução: a cárie dentária é a doença oral mais prevalente em todo o mundo. A pesquisa de perfis elementares nos dentes é uma importante ferramenta para o estudo desta doença e para desenvolver possíveis planos de prevenção e tratamento. A hidroxiapatite (HA) é o maior constituinte dos tecidos dentários e os oligoelementos desempenham um papel ativo na sua constituição pois podem incorporá-la e modificar a sua composição química e, conseqüentemente, a resposta perante a cárie. **Objetivos:** com este estudo pretende-se identificar os elementos presentes em dentes saudáveis e cariados e fazer uma comparação para verificar possíveis diferenças significativas. **Materiais e métodos:** Um total de 30 molares definitivos humanos foram utilizados para este estudo, divididos em dois grupos: o primeiro constituído por 20 dentes cariados e o segundo por 10 dentes saudáveis. Após terem sido moídos com um pilão e almofariz, foram analisados por um espectrómetro de fluorescência de raios-X por dispersão em comprimento de onda (WDXRF). **Resultados:** 12 elementos foram detetados (Ca, P, Na, Mg, Cl, Zn, Sr, Al, K, Fe, Cu e S), havendo concentrações estatisticamente superiores nos dentes cariados para o Ca, Sr e Mg, inferiores nos cariados para o P, Na e Cl e sem alterações no caso do Zn. **Conclusão:** o Ca, Sr e Mg desempenham um papel ativo na remineralização dos tecidos dentários cariados, por serem elementos com capacidade de ligação à HA, ao passo que o P, Na e Cl perdem-se com a restante estrutura mineral do dente. O Zn tem baixa capacidade de remineralização comparado ao Ca e ao Sr, sendo que estes dois, após a sua ligação à HA, evitam a do Zn.

Palavras-chave: cárie dentária; oligoelementos; hidroxiapatite; WDXRF.

Abstract

Introduction: dental caries is the most prevalent disease in the world. The search for elementary profiles in teeth is an important tool to study this disease and to develop possible ways of prevention and treatment. Hydroxyapatite (HA) is the major constituent of dental tissues and trace elements play an active role in its constitution because they can incorporate it and modify its chemical composition and therefore the way it responds towards the caries. **Objectives:** this study aims to identify the elements present in healthy and carious teeth and make a comparison between them to identify possible significant differences. **Materials and methods:** a total of 30 permanent human molars were used in this study, divided in two groups: one with 20 carious teeth and the other with 10 healthy ones. After being crushed with a mortar and pestle, they were analyzed by wavelength dispersive X-ray fluorescence (WDXRF). **Results:** 12 elements were detected (Ca, P, Na, Mg, Cl, Zn, Sr, Al, K, Fe, Cu e S), with statistically higher concentrations in carious teeth for Ca, Sr and Mg, lower in carious teeth for P, Na and Cl, and no differences for Zn. **Conclusion:** Ca, Sr and Mg play an active role in remineralization of carious tooth tissue, because of their ability to bond with HA, whereas P, Na and Cl are lost along with the rest of the decayed mineral structure. When compared with Ca and Sr, Zn has low ability of remineralization, because after the bonding of those two elements with HA, they avoid the Zn to link too.

Keywords: dental caries; trace elements; hydroxyapatite; WDXRF.

Índice

I – Introdução	14
1. Hidroxiapatite	14
2. Estrutura dentária	14
2.1. Polpa.....	14
2.2. Esmalte	14
2.3. Dentina	15
2.4. Cimento	16
3. Desenvolvimento dentário	16
4. Cárie dentária	16
4.1. Fisiopatologia	17
4.2. Epidemiologia	18
4.3. Fatores etiológicos.....	18
4.4. Placa bacteriana.....	20
4.5. Saliva.....	20
4.6. pH.....	21
5. Elementos.....	21
6. Oligoelementos	22
7. Elementos nos tecidos dentários	23
7.1. Cálcio	24
7.2. Fósforo	25
7.3. Sódio.....	25
7.4. Magnésio	25
7.5. Cloro.....	25
7.6. Estrôncio.....	25
7.7. Zinco.....	26
7.8. Ferro	26

7.9. Enxofre	26
7.10. Potássio.....	27
7.11. Alumínio.....	27
7.12. Cobre	27
8. Análise elementar	28
II – Materiais e Métodos	29
1. Objetivos	29
2. Colheita e caracterização da amostra.....	29
3. Preparação da amostra	30
4. Critérios de inclusão	31
5. Critérios de exclusão.....	31
6. Caracterização analítica	32
III – Resultados.....	34
IV – Discussão	40
V – Conclusão	45
VI – Implicações Clínicas.....	46
VII – Bibliografia.....	51

Índice de Figuras

Figura 1 – Dente antes da moagem.	31
Figura 2 – Dente antes da moagem.	31
Figura 3 – Desinfecção do pilão.....	31
Figura 4 – Desinfecção do almofariz.	31
Figura 5 – Exemplo de resultados da análise elementar de um dente.	33

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Concentrações em ppm de elementos detetados com erro inferior a 5%.	35
Tabela 2 – Concentrações em ppm de elementos detetados com erro superior a 5% (*).	36
Tabela 3 – Teste de normalidade Shapiro-Wilk	37
Tabela 4 – Estatística de grupo para o elemento cálcio.....	37
Tabela 5 – Estatística de grupo para o elemento fósforo.....	37
Tabela 6 – Estatística de grupo para o elemento sódio.....	37
Tabela 7 – Estatística de grupo para o elemento magnésio	38
Tabela 8 – Estatística de grupo para o elemento cloro	38
Tabela 9 – Estatística de grupo para o elemento estrôncio.....	38
Tabela 10 – Estatística de grupo para o elemento zinco.....	39
Tabela 11 – Diferença das concentrações médias (teste t-Student para amostras independentes) entre o grupo I e II para todos os elementos em estudo	39

Lista de Siglas

WDXRF – Fluorescência de raios-X por dispersão em comprimento de onda

XRF – Fluorescência de raios-X

HA – Hidroxiapatite

Ca – Cálcio

P – Fósforo

Na – Sódio

Mg – Magnésio

Cl – Cloro

Sr – Estrôncio

Zn – Zinco

Fe – Ferro

S – Enxofre

K – Potássio

Al – Alumínio

Cu – Cobre

I – Introdução

1. Hidroxiapatite

O dente é constituído por três tecidos mineralizados: o esmalte, a dentina e o cimento (Hanć, Olszewska, & Barańkiewicz, 2013). O principal componente comum a estes tecidos é a hidroxiapatite (HA) (Fischer, Wiechula, & Przybyła-Misztela, 2013), que, quimicamente, apresenta a seguinte fórmula: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Kohn, Morris, & Olin, 2013).

A HA apresenta uma estabilidade elementar particular que, durante a vida, pode sofrer alterações na sua composição (Fischer, et al., 2013). Sob circunstâncias fisiológicas, durante o processo de mineralização, vários elementos podem ser incorporados, que podem ser fisiológicos ou tóxicos (Fischer, et al., 2013).

2. Estrutura dentária

O dente humano é um sistema complexo de tecidos especializados: esmalte, dentina, cimento e polpa, dividido em duas partes, a coroa e a raíz (Anjos, et al., 2004). Destes, os tecidos duros apresentam diferentes quantidades de compostos orgânicos e inorgânicos e revestem o único tecido mole deste órgão (Rošin-Grget, Peroš, Sutej, & Bašić, 2013).

2.1. Polpa

A polpa dentária ocupa o centro do dente e consiste em tecido mole. Cada órgão pulpar reside na câmara, rodeada por dentina que contem os prolongamentos de células que a formaram (Amr & Helal, 2010).

A maior parte da polpa dentária tem composição semelhante a tecido conjuntivo, contendo vários tipos de células, fibras de colagénio, fibras nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos (Anjos, et al., 2004).

2.2. Esmalte

O esmalte dentário é composto por uma fase orgânica e uma fase inorgânica (Ghadimi, et al., 2013), sendo o tecido calcificado mais duro do corpo humano (Hanć, et al., 2013).

É constituído por 96% de matéria inorgânica, maioritariamente HA; 4% de matéria orgânica, que consiste essencialmente em proteínas e concentrações menores de proteoglicanos e lípidos; e água (Hanć, et al., 2013). A fase inorgânica do esmalte é também constituída por elementos incorporados, tais como Na, Mg, K, Cl, Zn, Fe e Sr (Castro, Hoogewerff, Latkoczy, & Almirall, 2010). A presença de vários oligoelementos no esmalte pode causar alterações nas suas propriedades (Shashikiran, Reddy, & Hiremath, 2007).

Histologicamente, é composto por prismas, constituídos por aglomerados de cristais bem organizados (Ghadimi, et al., 2013). Entre os prismas existem poros ocupados por água e proteínas (Waidyasekera, Nikaido, Weerasinghe, Wettasinghe, & Tagami, 2007), formando canais de passagem para ácidos, compostos minerais e iões (Rošin-Grget, et al., 2013). Assim, esta difusão de iões ocorre na cavidade oral devido à contínua desmineralização e remineralização da HA (Enomoto, et al., 2012).

Sendo o esmalte o tecido mais mineralizado e mais duro do corpo humano e, por apresentar na sua composição baixas concentrações de compostos orgânicos, raramente ocorrem reações metabólicas neste tecido após a formação dentária (Enomoto, et al., 2012).

O esmalte define a forma e contorno da coroa, cobrindo a parte do dente exposta ao meio oral (Shashikiran, et al., 2007) e, tem como função, proteger o tecido subjacente que é a dentina (Anjos, et al., 2004).

2.3. Dentina

A dentina é constituída por 70% de matéria inorgânica mineralizada, 20% de matéria orgânica e 10% de água (Hanć, et al., 2013). Comparado ao esmalte, é um tecido menos duro e menos mineralizado (Castro, et al., 2010).

O material inorgânico da dentina é composto principalmente por HA, enquanto que o material orgânico é constituído por 90% de fibras de colagénio tipo I, citratos, lípidos e proteínas não colagénias, incluindo as fosfoproteínas e proteoglicanos (Geraldo-Martins & Marques, 2009). Apresenta túbulos dentinários na sua matriz calcificada, preenchidos por prolongamentos odontoblásticos (Geraldo-Martins & Marques, 2009). Após a conclusão do desenvolvimento da dentina, estes prolongamentos mantêm-se na sua estrutura e podem mediar algumas reações metabólicas (Kumagai, Fujita, Endo, & Itai, 2012) que levam a possíveis processos de regeneração e, consequentemente, podem fornecer informações de alterações elementares mais recentes (Castro, et al., 2010).

Este é um tecido interno que é rodeado por esmalte na porção coronária e cimento na porção radicular e, em circunstâncias normais, não é afetada pelo meio oral (Kumagai, et al., 2012).

2.4. Cimento

O cimento é composto por 50% de matéria inorgânica, maioritariamente HA, 45% de substâncias orgânicas e 5% de água (Hanć, et al., 2013). A porção orgânica é caracterizada por 90% de colagénio tipo I, sendo o resto preenchido por proteínas não colagénias, que inclui as glicoproteínas e proteoglicanos, lípidos e citratos (Kim, et al., 2013).

3. Desenvolvimento dentário

Os dentes são anatomicamente complexos, compostos por três tipos diferentes de tecidos calcificados que contêm diferentes concentrações elementares, de acordo com as características próprias do desenvolvimento (Gomes, et al., 2004). Os dentes definitivos começam o seu desenvolvimento durante a vida fetal (Fischer, et al., 2013), ocorrendo num padrão de mineralização incremental bem definido (Arora, et al., 2006). De acordo com o tipo de dente, este processo ocorre em tempos diferentes (Castro, et al., 2010). No caso dos primeiros molares definitivos, inicia ao nascimento e termina aos 3 anos; nos incisivos e caninos a formação começa durante o primeiro ano de vida e termina por volta dos 5-6 anos; no caso dos terceiros molares, a mineralização desencadeia-se aos 8 anos e completa-se na adolescência (Kamenov & Gulson, 2014). É nestas etapas iniciais da vida que a composição elementar começa a estabilizar (Castro, et al., 2010). Esta incorporação de elementos deve-se à presença dos mesmos no meio ambiente durante e após o período de mineralização dos tecidos dentários (Shashikiran, et al., 2007) que, na fase de erupção, apresentam aproximadamente 30% de mineralização (Hanć, et al., 2013).

4. Cárie dentária

A cárie dentária é descrita pela literatura como um problema de saúde pública nas populações desde o início do século XX (Cangussu & Lopes, 2012). É a doença oral mais prevalente, atingindo quase a totalidade das pessoas, frequente em todas as faixas etárias, independentemente da etnia ou condição social, assim como a principal causa de perda de dentes (Areias, et al., 2010). A explicação inicial para o desenvolvimento da

cárie foi delineada tendo em conta a bactéria como fator etiológico da doença (Costa, Adelário, Vasconcelos, & Abreu, 2012).

A cárie pode ser definida como um processo de dissolução dos tecidos dentários, causada pela ação bacteriana na superfície do dente e mediado por um fluxo físico-químico de iões dissolvidos na água (Silva, 2009). Esta doença deve ser vista como um conceito que, como tantos outros, sofre revisões na sua interpretação de fatores etiológicos, alterando assim as estratégias relativas à prevenção e ao tratamento (Lima, 2007). Por isso, as teorias descritivas da cárie, têm sofrido alterações ao longo do tempo e passou a ser compreendida como uma doença multifatorial, dependendo não apenas da presença de microrganismos, mas também pelas condições gerais, sociais e individuais (Costa, et al., 2012).

A cavidade oral favorece o desenvolvimento de vários microrganismos, visto que se trata de um ambiente húmido, com temperatura relativamente constante entre os 35°C e os 36°C, um pH de 7, que, porém, não pode ser considerado um meio homogéneo (Geraldo-Martins & Marques, 2009). Portanto, a cárie é um problema complexo e multifatorial com características populacionais e, por conseguinte, a simples eliminação do microrganismo não é suficiente para prevenir a doença, pois têm de ser contabilizados fatores de risco como os ambientais e os comportamentais (Costa, et al., 2012).

Pelo fato de ser uma doença ubiqüitária, apesar de sofrer alterações geográficas, a cárie afeta desfavoravelmente a saúde oral e geral do indivíduo diminuindo a função mastigatória, a estética, a fonética e, ainda, alterando o desenvolvimento psicossocial, causando dor e provocando possíveis complicações infecciosas locais e sistémicas (Areias, et al., 2010).

Posto isto, todos estes fatores e conceitos servem para salientar a importância do estudo químico dos tecidos dentários, pois apresenta elevado interesse em relação à problemática da cárie dentária (Peedikayil, Kumar, & Thangavelu, 2013).

4.1. Fisiopatologia

A cárie dentária era descrita, há mais de cem anos, como uma destruição localizada e progressiva do dente iniciada pela dissolução ácida da superfície externa do mesmo (Rošin-Grget, et al., 2013). Atualmente, deve-se definir a cárie dentária como uma desmineralização do esmalte provocada pelo desequilíbrio frequente do fenómeno desmineralização-remineralização, durante um determinado período de tempo,

produzida pela ação de ácidos derivados do metabolismo de hidratos de carbono na placa bacteriana, que prejudica o indivíduo, caracterizada por sinais (Lima, 2007).

A alta frequência de consumo de hidratos de carbono aumenta os episódios de desmineralização (Geraldo-Martins & Marques, 2009). Isto porque funcionam como substrato para os microrganismos existentes na placa bacteriana, que produzem ácidos à superfície do dente (Rošin-Grget, et al., 2013). Estes ácidos provocam uma diminuição do pH e consequente desmineralização dos tecidos dentários (Martins, Macêdo, Muniz, Carvalho, & Moreira, 2011).

A cárie é, então, despoletada pela eluição de iões inorgânicos do esmalte, provocada pelos ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano (Enomoto, et al., 2012). Continuando a existir fornecimento de substrato metabólico à placa bacteriana, a infecção perpetua-se levando à progressão da dissolução dos tecidos dentários (Anderson, 2002).

4.2. Epidemiologia

De acordo com relatórios da OMS, a cárie dentária apresenta-se como a doença mais prevalente a nível global, representando um problema significativo de saúde pública na maioria dos países industrializados, afetando 60% a 90% das crianças e a grande maioria dos adultos (Galvão, Proença, & Barroso, 2012). É uma doença com grande caráter epidemiológico na saúde oral (Cangussu & Lopes, 2012) e é considerada a doença infecciosa mais comum em todo o mundo (Riyat & Sharma, 2009a; Daglia, et al., 2011), sendo que, no caso de Portugal, a epidemiologia oral demonstra que continua a ser altamente prevalente (Bravo-Pérez, et al., 2014).

4.3. Fatores etiológicos

A saúde oral e sistémica têm em comum fatores de risco relacionados com a dieta, consumo de tabaco e álcool (Petersen & Lennon, 2004). A história da cárie dentária, em relação à sua etiopatogenia, tem sido alvo de diversas teorias (Costa, et al., 2012).

Keyes propôs em 1969 um modelo no qual existe uma interação entre três principais fatores para determinar o processo de desenvolvimento da cárie: a bactéria, o substrato e o hospedeiro, representados, respetivamente, pelos microrganismos da placa bacteriana, a dieta, os dentes e a saliva (Enomoto, et al., 2012). Qualquer alteração num dos componentes desta tríade, pode levar a modificações no processo da cárie (Geraldo-

Martins & Marques, 2009). Posteriormente, Newbrun adicionou ao modelo de Keyes o tempo como quarto fator etiológico, definindo a cárie como uma doença multifatorial (Enomoto, et al., 2012). O tempo é importante nesta doença, visto que se trata de um processo moroso e crônico, interagindo com os restantes fatores, resultando assim na lesão cariiosa (Geraldo-Martins & Marques, 2009). É considerado um fator etiológico muito importante porque a cárie não ocorre como um evento único, mas sim como um efeito cumulativo de eventos que, com o passar do tempo, dinamiza o fenómeno de sucessivos ciclos de desmineralização-remineralização que entra em desequilíbrio e resulta na perda de tecido mineral e consequente cavitação (Lima, 2007).

Um conjunto de microrganismos está na base do desenvolvimento da cárie, no qual a *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* são consideradas as mais influentes (Al-Shalan, 2009; Daglia, et al., 2011). A sua presença é inquestionável e indispensável, dado que o processo de cárie se inicia pelo metabolismo bacteriano, porém, deve ser considerado um fator participativo e não determinante, visto que por si só não culmina na doença (Lima, 2007). A microbiota desempenha um papel fundamental na saúde, pois contribui para o sistema imunológico e providencia resistência a patógenos, mas, por outro lado, constitui também um reservatório de bactérias com capacidade patogénica para os tecidos do hospedeiro (Geraldo-Martins & Marques, 2009).

A manipulação dos alimentos naturais pelo ser humano prejudicou certas propriedades, levando ao desequilíbrio da biodiversidade da flora oral e, consequentemente, ao aumento da quantidade de alimentos cariogénicos (Lima, 2007). Devido a este tipo de alimentos, a dieta é tida em conta como uma das grandes causas da doença, determinada pela presença de hidratos de carbono, que servem de substrato para os microrganismos da cavidade oral produzirem ácidos orgânicos, que desmineralizam os tecidos dentários e desencadeiam a lesão (Geraldo-Martins & Marques, 2009). Deste modo, a cárie é considerada uma doença infecciosa oportunista, com influência dos componentes salivares e de hidratos de carbono provenientes da dieta (Martins, et al., 2011).

Por último, a suscetibilidade do hospedeiro está relacionada com o indivíduo ou com o próprio dente, sendo que, em ambos os casos, existem fatores extrínsecos e intrínsecos (Costa, et al., 2012). No primeiro caso, a inserção sociocultural é o principal fator extrínseco e os intrínsecos referem-se ao fluxo, composição e capacidade tampão da saliva, hereditariedade e fatores imunológicos (Lima, 2007). No segundo caso, os

fatores extrínsecos são ambientais e locais, enquanto os intrínsecos dizem respeito a fatores de regulação da mineralização durante a formação dentária (Rošin-Grget, et al., 2013). Ambos vão determinar um maior ou menor grau de resistência dos tecidos à dissolução por parte dos ácidos (Lima, 2007).

Posto isto, todas as estratégias adotadas para controlar os fatores etiológicos, conseguem apenas diminuir a incidência da cárie sem, no entanto, erradicá-la (Lima, 2007).

4.4. Placa bacteriana

A *Streptococcus mutans* e outras bactérias, colonizam as superfícies dentárias formando um biofilme denominado de placa bacteriana (Anderson, 2002). Constitui uma estrutura fortemente aderida à superfície do dente e contém grandes quantidades de microrganismos na sua composição (Martins, et al., 2011).

O primeiro investigador a analisar a placa bacteriana foi Antonie van Leeuwenhoek no século XVI, sugerindo um possível envolvimento bacteriano (Geraldo-Martins & Marques, 2009). Atualmente pode-se afirmar que a placa bacteriana é composta por inúmeras espécies de microrganismos acumuladas nas superfícies dentárias, embebidas numa matriz extracelular de polímeros do hospedeiro e de origem microbiana, envolvendo mais de 500 espécies de bactérias, sendo o grupo predominante o dos estreptococos (Geraldo-Martins & Marques, 2009).

4.5. Saliva

A saliva é maioritariamente secretada por três pares de glândulas: parótidas, sublinguais e submandibulares (Watanabe, et al., 2011). Estas extraem água e eletrólitos do plasma através de capilares adjacentes, havendo reabsorção de alguns eletrólitos e secreção de outros durante a sua passagem pelos ductos (Watanabe, Tanaka, Shigemi, Hayashida, & Maki, 2009). Assim, a saliva mista contém 99% de água e a restante é constituída por compostos orgânicos e inorgânicos, bactérias, leucócitos (Watanabe, et al., 2011) e, também, elementos como o Na, K, Cl, Ca, bicarbonato e fosfato (Geraldo-Martins & Marques, 2009). A produção e composição da saliva é regulada por vários estímulos como o sabor, olfato, mastigação, dor e agressão (Watanabe, et al., 2009). O fluxo salivar varia de 1 a 2 ml por minuto e auxilia na remoção de resíduos alimentares e microrganismos não aderidos às superfícies dentárias (Geraldo-Martins & Marques, 2009).

A saliva na cavidade oral exerce funções mecânicas, químicas, bacteriostáticas (Geraldo-Martins & Marques, 2009) e de proteção das estruturas dentárias, dependente dos níveis de pH do meio oral (Martins, et al., 2011). Tem a capacidade de neutralizar os ácidos promovendo o denominado “efeito tampão”, possuindo igualmente um papel primordial na substituição dos iões que vão sendo perdidos durante o processo de desmineralização (Rošin-Grget, et al., 2013). Os dentes estão em constante contato com a saliva (Ghadimi, et al., 2013) e, por isso, dentro dos limites fisiológicos de pH, e por ser constituída por altas concentrações de Ca e fosfato, que a tornam numa substância supersaturada em relação à HA, promovem a manutenção da sua integridade (Rošin-Grget, et al., 2013).

Muitos dos elementos que se encontram abundantemente na saliva afetam a composição superficial do esmalte (Ghadimi, et al., 2013) havendo, por isso, relação entre alguns desses elementos e a cárie, pelo fato de poderem passar da saliva para a superfície dentária devido às constantes desmineralizações e remineralizações (Watanabe, et al., 2011).

4.6. pH

A lesão cariosa é um produto direto de alterações contínuas de pH na cavidade oral, sendo o resultado do desequilíbrio do fenómeno de desmineralização-remineralização de iões presentes na saliva, como o Ca e o fosfato, sobre a superfície dentária (Silva, 2009). Este desequilíbrio, ocorre quando se atingem certos valores de pH que fazem com que a saliva fique insaturada em relação à HA resultando na sua desmineralização (Rošin-Grget, et al., 2013). O pH crítico do meio oral para que se dê este desequilíbrio está situado entre 5,2-5,7 no caso do esmalte e 6-6,5 para a dentina e cimento (Silva, 2009). A diferença destes valores deve-se à diferença da composição dos respetivos tecidos, ou seja, o cimento e a dentina possuem mais água e matéria orgânica, não sendo necessário haver uma diminuição acentuada do pH para que as lesões cariosas se iniciem nestes tecidos em comparação ao esmalte que é mais resistente (Geraldo-Martins & Marques, 2009).

5. Elementos

Os elementos são um componente básico de todos os tecidos de organismos vivos (Fischer, et al., 2013). Existem elementos essenciais e não-essenciais, tendo diferentes destinos no corpo humano (Reynard & Balter, 2014). No primeiro caso,

existe um envolvimento ativo em reações bioquímicas e uma associação com várias moléculas orgânicas do corpo (p.e. o ferro com a hemoglobina) (Reynard & Balter, 2014) que desempenham um papel vital nas funções dos tecidos e órgãos (Fischer, et al., 2013). Por outro lado, os elementos não-essenciais não têm um papel importante no organismo, mas têm a tendência de imitar o metabolismo químico dos essenciais, ao serem processados de uma forma passiva por processos biológicos com propriedades químicas semelhantes aos processos desses elementos (Reynard & Balter, 2014). O organismo humano absorve também elementos tóxicos, cuja presença no meio ambiente é o resultado da própria existência natural do elemento ou de atividades industriais (Fischer, et al., 2013).

De uma forma geral, os elementos são absorvidos no trato gastro-intestinal consoante as necessidades do organismo e as suas concentrações são reguladas de forma a permanecer em intervalos normais (Reynard & Balter, 2014). O défice ou o excesso de elementos, resultado de exposição ao meio ambiente, pode levar a vários efeitos clínicos (Brown, et al., 2004). Após a absorção, propagam-se pelos diferentes tecidos e órgãos, havendo trocas dinâmicas nos tecidos moles e acumulação nos tecidos duros (Fischer, et al., 2013).

Em relação à medicina dentária e à saúde oral, o papel dos elementos tem vindo a sofrer um crescente reconhecimento (Hare, Austin, Doble, & Arora, 2011) e, o seu estudo, é importante na avaliação, por exemplo, do desenvolvimento da cárie dentária (Li, He, Peng, & Jin, 2013). Isto porque, as propriedades físico-químicas de uma substância, neste caso o dente e a respetiva composição elementar, são a manifestação da sua estrutura (Riyat & Sharma, 2009a).

Os dentes são considerados importantes biomarcadores pois contêm informações devido à incorporação de elementos nos seus tecidos e têm sido utilizados na avaliação de fatores nutricionais, fisiológicos e ambientais que afetam as concentrações de metais no ser humano (Alomary, Al-Momani, Obeidat, & Massadeh, 2012). Esta importância deve-se, primariamente, ao seu metabolismo lento e fácil obtenção da amostra (Kumagai, et al., 2012).

6. Oligoelementos

Os minerais essenciais para o ser humano dividem-se em: macroelementos, microelementos e elementos traço ou oligoelementos (Sizer & Whitney, 2013).

Os oligoelementos são definidos como substâncias inorgânicas presentes nos tecidos animais em quantidades mínimas, independentemente da sua abundância no meio ambiente (Peedikayil, et al., 2013). Desempenham um papel importante e complexo no metabolismo humano, podendo ser benéficos ou nefastos para a saúde, apesar das suas baixas concentrações (Li, et al., 2013) e são reconhecidos como fatores importantes com influência na vida (Carvalho, Brito, & Barreiros, 1998). A presença ou ausência de oligoelementos no meio ambiente, influencia a sua disponibilidade para o ser humano (Amr & Helal, 2010) podendo ser absorvidos através da pele, ingestão de água e alimentos, sendo depois distribuídos pelo organismo, conseguindo inclusivamente incorporar a estrutura da HA (Ghadimi, et al., 2013). Este processo dá-se devido à estrutura porosa do dente, que desempenha um papel essencial na incorporação de oligoelementos, cujo meio de transporte consiste em fluidos (Reynard & Balter, 2014).

Há muito que se sabe que os oligoelementos incorporam as bio-apatites durante a vida de um organismo (Reynard & Balter, 2014). Os valores das suas concentrações e a respetiva correlação com os tecidos onde se encontram, podem fornecer importantes informações sobre qualquer papel patogénico ou terapêutico (Carvalho, et al., 1998).

7. Elementos nos tecidos dentários

Devido às características dos tecidos dentários, a sua composição elementar proporciona uma boa perspetiva acerca da interação entre o ser humano e o meio ambiente (Oprea, Szalanski, Gustova, Oprea, & Buzguta, 2009). A análise química das concentrações elementares, amplia o conhecimento da etiologia das doenças dentárias e pode ser utilizada para fins de diagnóstico, prevenção e tratamento (Zaichick, 2009). Por este motivo, o estudo da incorporação dos oligoelementos nos tecidos dentários é considerada de elevada importância devido às suas aplicações a nível clínico (Oprea, et al., 2009).

A qualidade e quantidade da composição elementar dos dentes depende de vários fatores como o local de residência, género, tipo de dente, hábitos tabágicos e dieta (Fischer, Wiechula, Postek-Stefańska, & Kwapuliński, 2009) e é influenciada pelo meio oral, estilo de vida e idade da pessoa ao longo do tempo, devido ao longo período que se estende desde a erupção à extração do dente (Tanaka, Maki, Hayashida, & Kimura, 2004). Por exemplo, elementos como os alcalino-terrosos (p.e. Mg, Sr, Ca) são incorporados em quantidades significantes durante a vida, enquanto os metais de

transição bivalentes (p.e. Zn, Cu e Fe) são incorporados em menor extensão (Reynard & Balter, 2014).

A reatividade da HA permite a incorporação de elementos nos tecidos dentários devido a reações de substituição que, por consequência, influenciam a solubilidade da mesma (Peedikayil, et al., 2013). Assim, a acumulação pós-eruptiva de alguns oligoelementos pode ocorrer no esmalte saudável por adsorção e trocas iônicas (Enomoto, et al., 2012), enquanto que outros acumulam apenas se a sua superfície estiver hipomineralizada devido a algum distúrbio do desenvolvimento ou devido ao processo de desmineralização próprio da cárie dentária (Peedikayil, et al., 2013). Relativamente à dentina, a incorporação elementar ocorre de maneira diferente comparando ao esmalte, porque é um tecido menos denso que contém grandes quantidades de fibras de colagénio e, devido à alta afinidade que certos elementos apresentam com esta proteína, após serem absorvidos, são incorporados neste tecido (Kumagai, et al., 2012). Tendo em conta estes fatores, pela análise elementar dos dentes, é possível determinar a correlação química entre os oligoelementos de dentes saudáveis e cariados (Peedikayil, et al., 2013).

Considerando este último capítulo, é importante explicar as características inerentes a cada um dos elementos considerados mais necessários em termos alimentares e também os mais comuns na estrutura dentária e no organismo do ser humano em geral. Desta forma, descrevem-se os elementos mais (Ca, P, Na e Mg) e menos (Cl, Sr, Zn, Fe, S, K, Al e Cu) abundantes na estrutura dentária (Fischer, et al., 2009).

7.1. Cálcio

O cálcio (Ca) é o mineral mais amplamente distribuído no organismo, sendo que o humano adulto contém cerca de 1200 g, 99% dos quais são constituintes dos ossos e dos dentes (Brown, et al., 2004), sendo o elemento mais abundante na estrutura mineral dos tecidos dentários (Fischer, et al., 2013). O conteúdo de Ca é relativamente constante ao longo do tempo e existe em maior concentração no esmalte quando comparado à dentina, porque é mais denso e tem maior conteúdo mineral (Souza-Guerra, et al., 2014).

O ser humano obtém este elemento de diferentes fontes alimentares como, por exemplo, produtos lácteos, legumes e cereais e a sua absorção pode ser comprometida pela deficiência em vitamina D ou distúrbios intestinais (Sizer & Whitney, 2013).

7.2. Fósforo

O fósforo (P) é o segundo mineral mais abundante no corpo humano, sendo que cerca de 85% encontra-se combinado com o Ca na estrutura óssea e dentária (Riyat & Sharma, 2010). É um componente do material genético pois integra as nucleoproteínas e, por isso, aparece associado principalmente a alimentos ricos em proteínas como, por exemplo, trigo, carne, ovos, leite e cereais (Sizer & Whitney, 2013).

7.3. Sódio

O sódio (Na) é importante no equilíbrio de fluidos e eletrólitos no corpo humano porque é o principal ião utilizado para manter o volume extracelular, é fundamental nas contrações musculares e transmissões nervosas e, 30% a 40% da sua concentração total é armazenada sob a forma mineral nos ossos e nos dentes (Sizer & Whitney, 2013).

7.4. Magnésio

O magnésio (Mg) é um elemento necessário para inúmeros processos metabólicos como a biossíntese dos lípidos, proteínas, ácidos nucleicos e também para a glicólise (Sizer & Whitney, 2013). Aproximadamente 60% está presente nos ossos e a restante reside nos líquidos extracelulares e espaços intercelulares dos músculos, coração, fígado e rim (Brown, et al., 2004).

As suas principais fontes alimentares são as leguminosas, frutos secos, carne e peixe (Sizer & Whitney, 2013).

7.5. Cloro

O cloro (Cl) é o principal ião negativo do corpo humano, acompanhando o Na no meio extracelular, ajudando assim na manutenção do equilíbrio eletrolítico e encontra-se principalmente no sal mas é comum a todo o tipo de dietas, ou seja, é ingerido diariamente pelo ser humano (Sizer & Whitney, 2013).

7.6. Estrôncio

O estrôncio (Sr) é um elemento que tem vindo a ser alvo de inúmeras investigações desde os anos 70/80, pelo seu possível efeito cariostático, maioritariamente devido às semelhanças que apresenta com o Ca, como por exemplo o raio iónico (Lippert & Hara, 2013). Assim, quimicamente, apresenta capacidade de

substituir o Ca na estrutura dentária (Li, et al., 2013). O Sr é um elemento que, embora se encontre nos organismos de seres vivos, ainda carece de conhecimentos maiores sobre a sua importância nutricional (Lippert & Hara, 2013).

7.7. Zinco

O zinco (Zn) é um elemento essencial para os humanos, com um papel importante na síntese proteica, funciona como co-fator de muitas enzimas que regulam o crescimento celular e os níveis hormonais e apresenta também uma função importante na formação e metabolismo de tecidos mineralizados (Alomary, et al., 2012).

As fontes alimentares mais ricas em Zn são as carnes, ovos, leite e gérmen de trigo (Sizer & Whitney, 2013). A ingestão em excesso pode causar pancreatite, anemia, mialgias, insuficiência renal aguda e morte; enquanto a ingestão insuficiente pode resultar numa reduzida taxa de crescimento (Alomary, et al., 2012).

7.8. Ferro

O ferro (Fe) é um dos oligoelementos mais importantes da dieta (Williams & Siegele, 2014), dos que existe em maior concentração no organismo e é amplamente distribuído por todo o corpo humano (Watanabe, et al., 2011). Está presente em todas as células e cumpre várias funções vitais: transporta oxigénio sob a forma de hemoglobina; armazena e facilita o uso de oxigénio nos músculos sob a forma de mioglobina; intervém no transporte de eletrões dentro das células sob a forma de citocromos; integra reações enzimáticas em vários tecidos (Alomary, et al., 2012).

As principais fontes alimentares de Fe são as leguminosas, carne, frutos secos e verduras (Sizer & Whitney, 2013). O seu défice vai interferir em todas as suas funções vitais e pode levar a um esgotamento de reservas sem qualquer comprometimento funcional da saúde geral, ou pode induzir anemia, afetando assim o funcionamento de vários órgãos, do sistema imunológico e o crescimento (Williams & Siegele, 2014). No sentido inverso, devido à rápida absorção deste elemento por parte do organismo, o seu excesso danifica os órgãos-alvo (fígado, rins e sistema cardiovascular) podendo levar a morbidez e mortalidade (Alomary, et al., 2012).

7.9. Enxofre

O enxofre (S) tem a função de auxiliar as proteínas a assumir as suas formas funcionais, além do fato de ser parte integrante das moléculas em todas as células do

organismo, sendo fundamental, principalmente, na síntese de compostos sulfatados (Amtmann & Armengaud, 2009). Devido à estreita relação com as proteínas, este é um elemento cuja principal fonte alimentar são os alimentos proteicos apesar de ser em percentagens baixas (Sizer & Whitney, 2013).

7.10. Potássio

O potássio (K) é o principal ião positivo no meio intracelular, desempenhando, por isso, um papel importante na transmissão nervosa, regulação da contração muscular e pressão arterial (Sizer & Whitney, 2013). Também é fundamental na manutenção do equilíbrio dos fluidos e eletrólitos e, conseqüentemente, na integridade celular (Markowitz, 2013).

É um elemento obtido pela ingestão de alimentos como verduras, chá e farinha de trigo (Sizer & Whitney, 2013).

7.11. Alumínio

O alumínio (Al) é um elemento que existe em grandes quantidades no meio ambiente, porém, sendo um elemento não-essencial, não está amplamente distribuído pelo corpo humano (Watanabe, et al., 2011). Apesar disto, vários estudos epidemiológicos, laboratoriais e em animais, indicam que possa ter um papel cariostático (Tanaka, et al., 2004), devido à inibição que exerce sobre o crescimento bacteriano e a respetiva capacidade de colonização do esmalte (Watanabe, et al., 2011).

As principais fontes de ingestão pelo ser humano são a água, aditivos alimentares industriais e alguns alimentos naturais (Sizer & Whitney, 2013).

7.12. Cobre

O cobre (Cu) é considerado um elemento essencial pela importância das suas funções, onde se destaca a interação com o metabolismo do Fe, nomeadamente na formação da hemoglobina e, também, a formação de elastina, tecido conjuntivo e colagénio (Sizer & Whitney, 2013). É um constituinte normal dos tecidos humanos, incluindo o esmalte dentário (Peedikayil, et al., 2013). Pensa-se que possa inibir a produção de ácidos pelas bactérias acidogénicas impedindo a desmineralização da HA, podendo, por isso, possuir capacidade cariostática, caso exista em concentrações elevadas (Watanabe, et al., 2009).

As principais fontes alimentares são as carnes, peixe, grãos integrais, legumes e nozes (Sizer & Whitney, 2013). A deficiência em Cu é rara podendo levar a anemia, afeções dos ossos e graves quadros de mal-nutrição mas, por outro lado, quando consumido em concentrações elevadas, acumula-se no sangue, fígado e rins causando vômitos, náuseas, diarreia e doença de Wilson (Alomary, et al., 2012).

8. Análise elementar

Barckla, no início do século XX, evidenciou pela primeira vez a análise elementar a partir da observação de espectros específicos de raios-X (Santos, Gama, França, Souza, & Matos, 2013).

A fluorescência de raios-X (XRF) está atualmente bem disseminada na comunidade científica devido às suas vantagens como a capacidade de realizar análises químicas multielementares, em diversos tipos de amostras, de uma forma rápida, não destrutiva, com baixo custo operacional (Santos, et al., 2013) e é dos métodos mais comuns para análise elementar com fins qualitativos ou quantitativos (Alomary, et al., 2012). Baseia-se na medição da intensidade dos raios-X específicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra, quando esta é excitada por partículas como elétrons, prótons ou íons (Santos, et al., 2013). A sua capacidade de detecção multielementar, por mais reduzidas que sejam as suas concentrações, providencia uma ferramenta importante para o estudo dos oligoelementos (Carvalho, et al., 1998).

De uma forma geral, a análise por XRF consiste em três fases (Santos, et al., 2013):

1. Excitação dos elementos constituintes da amostra;
2. Dispersão dos raios-X característicos emitidos pela amostra;
3. Detecção dos raios-X.

A fluorescência de raios-X com dispersão por comprimento de onda (WDXRF) desenvolveu-se nos meados da década de 60 e é baseada na produção e detecção de raios-X característicos emitidos pelos elementos presentes na amostra, quando os átomos que a constituem são excitados (Alomary, et al., 2012). Consequentemente, vão emitir linhas espectrais específicas do elemento, cuja intensidade é diretamente proporcional à sua concentração (Santos, et al., 2013).

II – Materiais e Métodos

1. Objetivos

A cárie dentária é a patologia oral mais comum e afeta todas as idades, sexos e raças de todas as populações do mundo. Esta doença tem sido alvo de inúmeras investigações e estudos de todo o tipo, com o objetivo de melhorar o conhecimento sobre as suas causas, mecanismos de ação, consequências e métodos de atuação tanto no tratamento como na prevenção.

Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar a cárie dentária sob um ponto de vista bioquímico, através de uma análise elementar do dente.

Desta forma definem-se como objetivos específicos desta investigação:

- Identificar os elementos presentes nos dentes saudáveis e cariados.
- Comparar as concentrações médias de cada elemento presente nos dentes saudáveis e cariados.
- Detetar diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações elementares de dentes saudáveis e cariados.

2. Colheita e caracterização da amostra

Este estudo foi realizado no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM), no laboratório WDXRF, com a colaboração da Clínica Dentária Universitária Egas Moniz.

Foram utilizados 30 molares definitivos humanos para este estudo. A amostra foi dividida em dois grupos: o primeiro constituído por 20 dentes cariados e o segundo constituído por 10 dentes saudáveis. Os dentes foram doados por indivíduos caucasianos, do sexo masculino com idades compreendidas entre os 50 e 70 anos de idade. Um estudo de Kumagai e colaboradores (2012) provou que as concentrações elementares diferem entre sexos e estabilizam a partir dos 50 anos e Shashikiran e colegas (2007) descobriram que existem variações elementares entre grupos étnicos. Assim, optou-se pela escolha de indivíduos dadores de dentes com estas características, com o intuito de diminuir a influência de outras variáveis nos resultados do presente estudo.

Os dentes saudáveis utilizados foram extraídos por motivos periodontais (Carvalho, Casaca, Marques, Pinheiro, & Cunha, 2001), ortodônticos (Kumagai, et al., 2012) ou protéticos (Li, et al., 2013).

3. Preparação da amostra

Após a extração, o dente foi enxaguado com água corrente da torneira para remover excessos de sangue (Carvalho, et al., 2001; Kamberi, Kqiku, Hoxha, & Dragusha, 2011) e de seguida foi lavado com água destilada (Arora, Hare, Austin, Smith, & Doble, 2011; Barton, 2011; Alomary, et al., 2012; Fischer, et al., 2013). Após a lavagem com água destilada, foi utilizada uma escova de dentes para remover superficialmente excessos de tecidos moles e outros resíduos (Barton, 2011; Peedikayil, et al., 2013). Procedeu-se à remoção por completo de qualquer resíduo de placa, tártaro, osso ou restos de tecidos moles com o auxílio de um destartarizador e curetas (Zaichick, 2009; Enomoto, et al., 2012; Li, et al., 2013). Posteriormente, cada dente foi individualmente desinfetado em cloramina a 0,5% durante 1 semana (Kamberi, et al., 2011). Por fim, os dentes foram conservados em água destilada, armazenados individualmente em contentores de plástico esterilizados e posteriormente numerados (Souza-Guerra, et al., 2010; Arora, et al., 2011; Alomary, et al., 2012; Li, et al., 2013). A água destilada foi substituída a cada semana.

Os dentes foram moídos individualmente com um pilão e almofariz de ágata, coberto por um saco de plástico para evitar a inalação de partículas e perda de amostra (Kamberi, et al., 2011; Peedikayil, et al., 2013) (Figura 1), até obter a amostra reduzida a pó (Figura 2), com granulometria compreendida entre 125-180 μm , sendo este intervalo definido pelas características próprias do WDXRF, para que possa ocorrer a leitura da amostra. Após a moagem de um dente, antes de passar para o seguinte, para reduzir as hipóteses de contaminação, o pilão e o almofariz foram desinfetados utilizando compressas esterilizadas embebidas em álcool etílico (Zaichick, 2009) (Figura 3 e 4).



Figura 1 – Dente antes da moagem.



Figura 2 – Dente após a moagem.



Figura 3 – Desinfecção do almofariz.



Figura 4 – Desinfecção do pilão.

4. Critérios de inclusão

Foram utilizados molares por serem dentes mais suscetíveis de ter lesões cáries do que pré-molares, caninos e incisivos (Riyat & Sharma, 2009b).

Os dentes cariados escolhidos, eram todos dentes com lesão cáries bem denotada e cavitação acentuada (Li, et al., 2013).

5. Critérios de exclusão

Dentes com fluorose ou com anomalias de desenvolvimento como hipoplasia do esmalte ou dentina foram excluídos (Shashikiran, et al., 2007).

Dentes com qualquer tipo de restauração e/ou tratamento endodôntico não foram considerados para este estudo (Carvalho, et al., 2001; Kamberi, et al., 2011; Fischer, et al., 2013).

Dentes inclusos não foram utilizados neste estudo porque as concentrações elementares são influenciadas pelo meio oral do indivíduo (Tanaka, et al., 2004).

6. Caracterização analítica

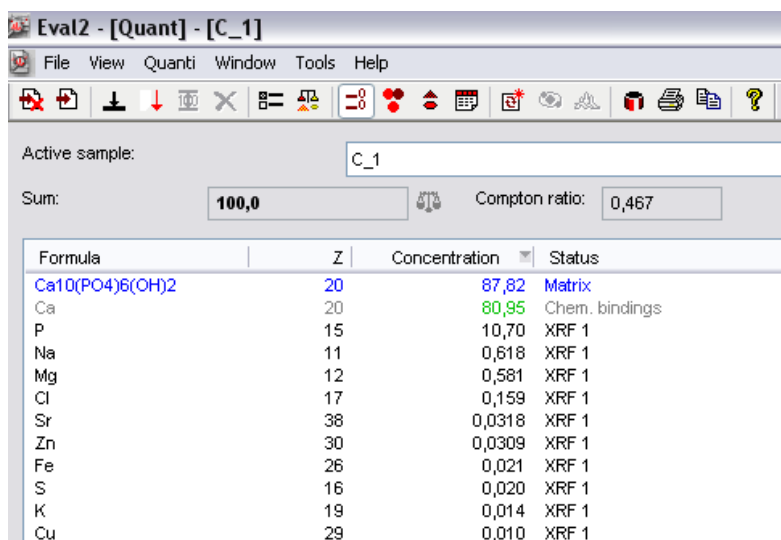
A determinação da composição elementar foi realizada utilizando o WDXRF (4 kW – Bruker AXS), em ambiente He, localizado no laboratório WDXRF do ISCSEM.

Cada amostra, previamente preparada e individualmente armazenada em contentores de plástico numerados, foi pesada. Após a pesagem, cada dente foi colocado em tubos próprios e foi verificado que todo o pó cobrisse a superfície do mesmo, para que a leitura fosse viável e exequível. De seguida, os tubos foram inseridos no WDXRF, onde foram analisados.

A análise foi realizada em vácuo para evitar a perda de sinal por absorção de ar, permitindo assim a deteção de elementos com número atómico (Z) baixo (Teruel, Alcolea, Hernández, & Ruiz, 2015).

No processo de medição a amostra é exposta a um feixe de radiação que vai interagir com o material da mesma, deslocando um eletrão das camadas mais internas do átomo, que vai ser substituído por outro proveniente de camadas mais externas (Santos, et al., 2013). Esta substituição promove libertação de energia sob a forma de radiação fluorescente, emitida em comprimentos de onda que são característicos de cada elemento, de intensidade proporcional à sua concentração (Santos, et al., 2013). Concluído este processo, os valores surgiram no visor, como demonstrado na figura 5.

Por fim procedeu-se à colheita dos dados necessários, nomeadamente as concentrações de todos os elementos detetados. Os dados recolhidos após as leituras pelo WDXRF, foram registados em partes por milhão (ppm) com 4 casas decimais.



Active sample: C_1

Sum: 100,0 Compton ratio: 0,467

Formula	Z	Concentration	Status
Ca10(PO4)6(OH)2	20	87,82	Matrix
Ca	20	80,95	Chem. bindings
P	15	10,70	XRF 1
Na	11	0,618	XRF 1
Mg	12	0,581	XRF 1
Cl	17	0,159	XRF 1
Sr	38	0,0318	XRF 1
Zn	30	0,0309	XRF 1
Fe	26	0,021	XRF 1
S	16	0,020	XRF 1
K	19	0,014	XRF 1
Cu	29	0,010	XRF 1

Figura 5 – Exemplo de resultados da análise elementar de um dente.

O tratamento dos dados foi realizado através do programa estatístico IBM – SPSS versão 23.0.

Foram aplicadas como medidas descritivas: medidas de localização (média) e medidas de dispersão (desvio padrão, mínimo e máximo). Foi aplicado o teste t-Student para amostras independentes.

A interpretação do teste estatístico foi realizada com base no nível de significância de $\alpha=0,05$, com um intervalo de confiança de 95%. Como critérios estatísticos definiram-se: para um α significativo ($p \leq 0,05$) observam-se diferenças entre os grupos; para um $p > 0,05$ não se observam diferenças significativas entre os grupos.

III – Resultados

Os elementos detetados neste estudo foram 12: Ca, P, Na, Mg, Cl, Sr, Zn, Fe, S, K, Al e Cu. O Ca, P, Na, Mg, Cl, Zn e Sr foram os únicos elementos detetados sempre com erro abaixo de 5% em todos os dentes, ao contrário dos restantes (Tabela 1). O Fe, S, K, Al e o Cu, foram detetados com erro superior a 5%, ou seja, as suas concentrações não podem ser consideradas para efeitos de tratamento estatístico (Tabela 2).

Valores com erro superior a 5% em XRF significam que o elemento em causa foi detetado com base na aquisição de sinal efetuada durante um certo tempo, mas que a concentração estimada tem uma incerteza superior ao aceitável.

Em alguns casos pontuais, alguns destes elementos (Tabela 2) foram detetados com erro inferior a 5%, mas, no conjunto, não formaram uma amostra suficiente para efeitos estatísticos.

Desta forma, a análise estatística foi realizada para os seguintes elementos: Ca, P, Na, Mg, Cl, Zn e Sr. Em primeiro lugar efetuaram-se testes de normalidade, neste caso, utilizando o teste Shapiro-Wilk, assumindo uma distribuição normal com um valor de $p > 0,05$. Assim, como indicado na tabela 3, para os elementos Ca, Mg e Cl, a amostra segue uma distribuição normal, ao contrário dos elementos P, Na, Sr e Zn, ao qual se efetuou validação dos dados face à normalidade ao remover *outliers* até obter um valor de $p > 0,05$.

Assim, para cada elemento, regista-se o N, a média, o mínimo, o máximo e o desvio padrão.

Para o Ca, uma vez que existia uma distribuição normal, o N é constituído por 20 no grupo I e 10 para o grupo II. No grupo I o valor mínimo registado foi 77,45, o máximo 82,21, apresentando uma média de $80,61 \pm 1,24$. No grupo II o valor mínimo registado foi 77,37, o máximo foi 81,81, apresentando uma média de $78,96 \pm 1,29$. Registou-se, de uma forma geral, uma média superior do grupo I (80,61) em relação ao grupo II (78,96) (Tabela 4).

Grupo	Amostra	Ca	P	Na	Mg	Cl	Zn	Sr
I	1	80,9500	10,7000	0,6180	0,5810	0,1590	0,0309	0,0319
	2	78,4000	13,1900	0,8430	0,4470	0,1520	0,0376	0,0288
	3	77,4500	14,1900	0,9600	0,5100	0,1600	0,0366	0,0169
	4	81,4300	9,8740	0,5930	0,8090	0,1180	0,0314	0,0376
	5	80,7600	10,6700	0,6480	0,6230	0,1050	0,2120	0,0303
	6	79,4300	12,1600	0,7000	0,5810	0,1790	0,0416	0,0258
	7	81,5100	10,1000	0,6000	0,5910	0,1510	0,0358	0,0309
	8	80,2100	11,3300	0,6690	0,6770	0,1140	0,0348	0,0331
	9	81,2900	10,3200	0,5830	0,6530	0,1070	0,0358	0,0335
	10	80,4000	10,8900	0,5850	0,5790	0,1420	0,4897	0,0149
	11	82,2100	9,3930	0,5130	0,6120	0,1240	0,0465	0,0395
	12	81,0500	10,4400	0,7080	0,6920	0,0895	0,0333	0,0315
	13	80,9000	10,4400	0,6510	0,6170	0,1430	0,0296	0,0241
	14	81,4500	10,1300	0,5700	0,6680	0,1080	0,0553	0,0236
	15	78,9600	12,5700	0,8870	0,6290	0,0977	0,0439	0,0149
	16	81,7400	9,8400	0,5980	0,6150	0,1070	0,0388	0,0514
	17	80,2500	11,2500	0,6550	0,6740	0,1550	0,0375	0,0226
	18	81,4100	10,0700	0,6130	0,6190	0,1300	0,0350	0,1100
	19	82,1400	9,3330	0,5670	0,6990	0,1230	0,0403	0,0306
	20	80,2800	11,1300	0,7020	0,7640	0,1030	0,0368	0,0266
II	1	79,4300	12,4300	0,7200	0,3930	0,1750	0,0303	0,0148
	2	79,2000	12,6500	0,7360	0,3980	0,1840	0,0303	0,0144
	3	78,6800	12,9900	0,8260	0,5060	0,1870	0,0320	0,0168
	4	79,4500	12,2900	0,7480	0,5010	0,1420	0,0366	0,0150
	5	79,4800	12,1700	0,7240	0,5770	0,1440	0,0345	0,0170
	6	78,8300	12,9300	0,8040	0,4390	0,1750	0,0370	0,0176
	7	81,8100	9,7680	0,5730	0,6710	0,1200	0,0303	0,0154
	8	77,3700	14,3200	0,9280	0,5060	0,1590	0,0387	0,0172
	9	77,4000	14,3400	0,9010	0,4580	0,1670	0,0439	0,0184
	10	77,9100	13,7800	0,8550	0,5020	0,1710	0,0366	0,0183

Tabela 1 – Concentrações em ppm de elementos detetados com erro inferior a 5%.

Grupo	Amostra	Fe	S	K	Al	Cu
I	1	0,0210*	0,0200*	0,0140*	-	0,0100*
	2	0,0130*	0,0326*	0,0180*	0,1740	0,0110*
	3	0,0100*	0,0358*	0,0190*	0,0250*	0,0120*
	4	0,0400	0,0326*	0,0523	0,0650*	0,0110*
	5	0,0160*	0,0455	0,0140*	-	0,0268
	6	0,0234*	0,0328*	0,0364	0,0370*	0,0110*
	7	0,0220*	0,0190*	0,0110*	-	0,0100*
	8	0,0251*	0,0414	0,0288	0,0290*	0,0100*
	9	0,0200*	0,0364	0,0140*	-	0,0100*
	10	0,0190*	0,0328*	0,0130*	-	0,0110*
	11	0,0233*	0,0230*	0,0130*	0,0130*	0,0100*
	12	0,0190*	0,0302*	0,0215*	-	0,0100*
	13	0,0239*	0,0220*	0,0333	0,0380*	0,0100*
	14	0,0220*	0,0370	0,0170*	-	0,0110*
	15	0,0220*	0,0450	0,0130*	-	0,0130*
	16	0,0210*	0,0274*	0,0160*	-	0,0120*
	17	0,0322	0,0282*	0,0328	0,0400*	0,0100*
	18	0,0220*	0,0260*	0,0140*	0,0310*	0,0110
	19	0,0255*	0,0270*	0,0194*	0,0180*	0,0100*
	20	0,0315	0,0385	0,0311	0,0350*	0,0110*
II	1	0,0150*	0,0230*	0,0180*	-	0,0120*
	2	0,0150*	0,0240*	0,0160*	-	0,0120*
	3	0,0180*	0,0315*	0,0180*	-	0,0110*
	4	0,0190*	0,0319*	0,0150*	-	0,0100*
	5	0,0275*	0,0327*	0,0200*	-	0,0140*
	6	0,0170*	0,0250*	0,0180*	-	0,0110*
	7	0,0160*	0,0289*	0,0150*	-	0,0110*
	8	0,0120*	0,0349*	0,0215*	0,0240*	0,0110*
	9	0,0130*	0,0250*	0,0180*	0,0380*	0,0120*
	10	0,0120*	0,0331*	0,0190*	0,0300*	0,0120*

Tabela 2 – Concentrações em ppm de elementos detetados com erro superior a 5% (*).

Elemento	Grupo	Shapiro-Wilk		
		Estatística	gl	Sig.*
Ca	I	0,908	20	0,058
	II	0,893	10	0,183
P	I	0,948	18	0,393
	II	0,886	10	0,154
Na	I	0,914	18	0,102
	II	0,953	10	0,700
Mg	I	0,962	20	0,590
	II	0,914	10	0,307
Cl	I	0,947	20	0,326
	II	0,920	10	0,356
Sr	I	0,949	18	0,405
	II	0,912	10	0,293
Zn	I	0,971	17	0,835
	II	0,901	10	0,228

Tabela 3 – Teste de normalidade Shapiro-Wilk.

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Ca	I	20	80,6110	1,2421	77,4500	82,2100
	II	10	78,9560	1,2940	77,3700	81,8100

Tabela 4 – Estatística de grupo para o elemento cálcio.

No que diz respeito ao P, devido às alterações sofridas para normalizar a distribuição da amostra, o grupo I tem um N de 18 com valor mínimo de 9,33, máximo de 12,57, levando a uma média de $10,59 \pm 0,86$. O grupo II, com um N de 10, apresenta como valor mínimo 9,77, máximo 14,34, resultando uma média de $12,77 \pm 1,32$. Desta forma, a média do grupo II (12,77) é superior à do grupo I (10,59) (Tabela 5).

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
P	I	18	10,5911	0,8642	9,3330	12,5700
	II	10	12,7668	1,3205	9,7680	14,3400

Tabela 5 – Estatística de grupo para o elemento fósforo.

No caso do Na, tal como o P, o N do grupo I e II é de, respetivamente, 18 e 10. No grupo I, o mínimo registado é de 0,513, máximo de 0,843, resultando uma média de $0,634 \pm 0,074$. No grupo II, o mínimo é de 0,573, o máximo de 0,928, com uma média de $0,781 \pm 0,104$. Regista-se assim, que o grupo II tem maior média (0,781) que o grupo I (0,634) (Tabela 6).

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Na	I	18	0,6342	0,0741	0,5130	0,8430
	II	10	0,7815	0,1040	0,5730	0,9280

Tabela 6 – Estatística de grupo para o elemento sódio.

No caso do Mg, o N é também constituído por 20 no grupo I e 10 no grupo II. No grupo I o valor mínimo é de 0,447, o máximo é de 0,809, com uma média de $0,632 \pm 0,08$. O grupo II apresenta valor mínimo de 0,393, máximo de 0,671, com média de $0,495 \pm 0,08$. Neste caso regista-se uma média superior do grupo I (0,632) em relação ao grupo II (0,495) (Tabela 7).

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Mg	I	20	0,6320	0,0802	0,4470	0,8090
	II	10	0,4951	0,0832	0,3930	0,6710

Tabela 7 – Estatística de grupo para o elemento magnésio.

Em relação ao Cl, o N mantém-se, tal como nos dois casos anteriores, com 20 para o grupo I e 10 para o grupo II. No primeiro caso, o valor mínimo é de 0,089, o máximo de 0,179, levando a uma média de $0,128 \pm 0,025$. No segundo caso, o valor mínimo é 0,120, o máximo é 0,187, obtendo uma média de $0,162 \pm 0,021$. Regista-se aqui maior média do grupo II (0,162) em relação ao grupo I (0,128) (Tabela 8).

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Cl	I	20	0,1284	0,0251	0,0895	0,1790
	II	10	0,1624	0,0212	0,1200	0,1870

Tabela 8 – Estatística de grupo para o elemento cloro.

Relativamente ao Sr, tal como o Na e o P, o N é de 18 e 10 para o grupo I e II respetivamente. O valor mínimo para o grupo I é 0,0149, contrastando com um máximo de 0,0395, concluindo na média de $0,0276 \pm 0,007$. O mínimo no grupo II é 0,0144, o máximo é 0,0184, apresentando uma média de $0,0165 \pm 0,002$. Nota-se então, uma média grupo I (0,0276) superior à média do grupo II (0,0165) (Tabela 9).

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Sr	I	18	0,0276	0,0071	0,0149	0,0395
	II	10	0,0165	0,0015	0,0144	0,0184

Tabela 9 – Estatística de grupo para o elemento estrôncio.

Por fim, no caso do Zn, o N é de 17 no que diz respeito ao grupo I e 10 em relação ao grupo II. O valor mínimo registado no caso do grupo I é de 0,0296, o máximo é de 0,0465, com média de $0,0368 \pm 0,0045$. No caso do grupo II, o valor mínimo é 0,0303, máximo de 0,0439, apresentando uma média de $0,0350 \pm 0,0044$. Relativamente ao Zn, a diferença entre as médias do grupo I e II é reduzida, com leve predomínio do grupo I (0,0368) sobre o grupo II (0,0350) (Tabela 10).

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Zn	I	17	0,0368	0,0045	0,0296	0,0465
	II	10	0,0350	0,0044	0,0303	0,0439

Tabela 10 – Estatística de grupo para o elemento zinco.

Tendo em conta o que está descrito anteriormente, a análise estatística foi aplicada utilizando o teste t-Student para avaliar uma possível diferença significativa das concentrações médias de cada elemento entre o grupo I e o grupo II.

Verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações médias do grupo I e II para os elementos: Ca ($p=0,002$), P ($p<0,001$), Na ($p<0,001$), Mg ($p<0,001$), Cl ($p=0,001$) e Sr ($p<0,001$) (Tabela 11).

No caso do Zn, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,318$)

ELEMENTO	GRUPO	MÉDIAS	P
Ca	I	80,6110	0,002
	II	78,9560	
P	I	10,5911	0,000
	II	12,7668	
Na	I	0,6342	0,000
	II	0,7815	
Mg	I	0,6320	0,000
	II	0,4951	
Cl	I	0,1284	0,001
	II	0,1624	
Sr	I	0,0276	0,000
	II	0,0165	
Zn	I	0,0368	0,318
	II	0,0350	

Tabela 11 – Diferença das concentrações médias (teste t-Student para amostrar independentes) entre o grupo I e II para todos os elementos em estudo.

IV – Discussão

A composição dos tecidos dentários não é estática, podendo alterar com a idade, meio ambiental, pH do meio oral e presença de cárie (Kumagai, et al., 2012). No dente cariado, a HA desmineraliza, modificando-se assim a sua configuração química, com possível incorporação de alguns elementos nas lesões cariosas, que ajudam na remineralização e, por isso, as suas concentrações em dentes cariados e saudáveis podem ser diferentes (Peedikayil, et al., 2013).

Apenas uma comparação relativa pode ser efetuada entre estes resultados e os de outros estudos, porque existem diferenças na preparação da amostra, nas características dos indivíduos dadores e, principalmente, na caracterização do método analítico. Neste estudo, a estimação dos perfis elementares foi efetuada com WDXRF, que é considerada uma técnica de eleição para avaliar amostras minerais, como é o caso da HA (Teruel, et al., 2015).

Assim sendo, na amostra analisada, os elementos detetados foram: Ca, P, Na, Mg, Cl, Sr, Zn, Fe, S, K, Al e Cu (Tabelas 1 e 2). Tendo em conta que os elementos detetados abaixo do limiar do erro, logo, com concentrações médias passíveis de tratamento estatístico, foram o Ca, P, Na, Mg, Cl, Zn e Sr (Tabela 1), os resultados vão de encontro ao estudo de Zaichick (2009) que avaliou as concentrações médias dos mesmos elementos em dentes definitivos saudáveis. Fischer e colaboradores (2009) mediram as concentrações médias de vários elementos em dentes decíduos e definitivos saudáveis, tendo detetado, maioritariamente, nestes últimos, os elementos do Ca, Na, Mg, K e do Zn. Assim, os resultados obtidos encontram-se dentro do esperado.

As médias das concentrações elementares para os dois grupos (Tabela 11), demonstram, de forma ordenada, quais os elementos mais e menos abundantes nos tecidos dentários. Ou seja, os elementos mais abundantes em dentes saudáveis são o Ca e o P, seguidos do Na e do Mg. Estes resultados vão de encontro aos estudos de Oprea e colaboradores (2009) e Riyat & Sharma (2009b) em que, embora com valores diferentes, o Ca e o P são os elementos mais abundantes em dentes saudáveis, e de Fischer e colaboradores (2009) e Amr & Helal (2010) em que o Na e o Mg são os elementos mais abundantes após o Ca e o P. De igual modo, em relação ao grupo I (dentes cariados) os elementos mais abundantes são o Ca e o P, seguidos do Na, Mg, Cl, Zn e o Sr. Apesar da lesão de cárie provocar perda de tecido e, consequentemente, perda de minerais, o Ca e o P continuam a ser os elementos mais abundantes mesmo em

dentes cariados, tal como os resultados de Riyat & Sharma (2009b) indicam. Isto deve-se à maioritária presença destes dois elementos que, sob a forma de ião fosfato de Ca, estão sempre relacionados um com o outro, assumindo as grandes concentrações reveladas (Riyat & Sharma, 2010). Amr & Helal (2010) também identificaram o Na e Mg como os elementos mais abundantes em dentes cariados excluindo o Ca e o P.

Apesar das suas concentrações não serem consideradas para tratamento estatístico, é importante referir a deteção de outros elementos: o Fe, o S, o K, o Al e o Cu. Estes elementos apresentavam concentrações abaixo do limite de deteção do equipamento. Todos estes elementos foram identificados por Ghadimi e colaboradores (2013), enquanto Amr & Helal (2010) detetaram Al, Fe, Cu e, este último, foi também observado por Kumagai e colaboradores (2012). Em todos estes casos foi utilizada uma técnica denominada espetrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). A ICP-MS é uma técnica diferente da utilizada neste estudo (WDXRF), com limites de deteção diferentes e, no primeiro caso, existe maior alcance e sensibilidade em todo o processo (Castro, et al., 2010). Assim, é normal que nestes estudos tenham sido identificados estes elementos em concentrações superiores, quando comparado à presente investigação.

Diferenças elementares entre dentes definitivos cariados e saudáveis já foram anteriormente demonstradas (Shashikiran, et al., 2007; Amr & Helal, 2010; Peedikayil, et al., 2013). Porém, por vezes a metodologia entre estudos varia e, ao contrário deste, existem estudos nos quais se efetuam análises elementares apenas em dentes saudáveis (Zaichick, 2009), apenas em dentes cariados (Gierat-Kucharzewska, Braziewicz, Majewska, Gózdź, & Karasinski, 2003), em dentes decíduos (Tanaka, et al., 2004), ou até somente num determinado tecido isolado (Peedikayil, et al., 2013).

A diminuição da concentração dos elementos nos dentes cariados é explicada pelo processo de formação da lesão cariosa, em que ocorre perda de todos os minerais do dente (Riyat & Sharma, 2009b). Nesta premissa inserem-se o P ($p<0,001$), o Na ($p<0,001$) e o Cl ($p=0,001$), visto que as suas concentrações são significativamente menores nos dentes cariados. Por outro lado, relativamente a minerais, o Ca é o principal consituente, mas, como se verificou, ao contrário desses elementos, este existe em maior concentração nos dentes cariados ($p=0,002$). Isto deve-se à grande capacidade de remineralização que o Ca exerce, ou seja, durante todo o processo da lesão de cárie, este elemento encontra-se saturado na saliva em relação à HA, providenciando uma possível remineralização e reestruturação (Enomoto, et al., 2012), ao contrário do que

acontece com o P, Na e Cl. Um estudo de Amr & Helal (2010), provou que o Ca está aumentado na presença de cárie.

Da mesma forma que o Ca está aumentado nos dentes cariados, acontece o mesmo com o Sr e com o Mg. O nível aumentado destes metais pode ser explicado pelo fato de existirem sob a forma de catiões divalentes e poderem substituir o Ca na HA (Alomary, et al., 2012).

O Mg é um elemento que existe em maior quantidade na dentina, mais precisamente, na dentina peritubular (Mlakar, et al., 2014). Um estudo realizado por Nakajima e colaboradores (2005) detetou que na dentina afetada por cárie, os túbulos dentinários ficaram obturados por depósitos minerais, nos quais o Mg se destacou, enquanto que a dentina saudável apresentava os túbulos abertos. Ou seja, quando ocorre o processo de desmineralização-remineralização próprio da lesão de cárie, o Mg tende a mineralizar a dentina. Um estudo, efetuado por Amr & Helal (2010), concluiu que o Mg existe em maiores concentrações nos dentes cariados. Aliando o fenómeno e o estudo descritos anteriormente, justifica-se o fato do Mg existir em concentrações significativamente superiores nos dentes cariados ($p < 0,001$), em relação aos dentes saudáveis, como se verificou neste estudo.

No caso do Sr, também se observou uma diferença significativamente ($p < 0,001$) maior nos dentes cariados. O íon do Sr é um elemento alcalino-terroso, tal como o Ca e, por isso, apresentam muitas semelhanças como, por exemplo, o raio iónico (Lippert & Hara, 2013). No entanto, por ser mais reativo (Riyat & Sharma, 2010), o Sr incorpora a HA por troca iónica com os íons de Ca perdidos durante o fenómeno de desmineralização-remineralização (Lippert & Hara, 2013). Como este fenómeno ocorre mais frequentemente em dentes cariados (Enomoto, et al., 2012), é nestes que a concentração de Sr vai ser superior, como se verificou neste estudo. O estudo de Amr & Helal (2010), identificou uma concentração superior de Sr em dentes cariados, porém, existem resultados paradoxais (Shashikiran, et al., 2007; Li, et al., 2013; Peedikayil, et al., 2013). Esta diversidade de resultados pensa-se que possa ocorrer por diversos fatores: diferentes origens do elemento, por exemplo a água que pode ser influenciada pela região geográfica (Lippert & Hara, 2013); pelo tipo de preparação e leitura da amostra (Li, et al., 2013); pelo fato de se realizar sobre dentes decíduos (Peedikayil, et al., 2013); ou ainda pelo fato de se considerar apenas o esmalte (Shashikiran, et al., 2007) em vez do dente como um todo como neste estudo, visto que o Sr tem capacidade de se ligar à HA, seja do esmalte, como da dentina ou do cimento (West, et al., 2013).

Em relação ao Zn, não existem diferenças significativas ($p=0,318$) entre as concentrações médias dos dentes saudáveis e cariados apesar de ser também um íon divalente. O Zn é um elemento que está presente de forma natural em todos os tecidos do organismo, inclusive nos dentes (Chasapis, Loutsidou, Spiliopoulou, & Stefanidou, 2011), incorporando a HA principalmente antes da erupção, apesar de poder ocorrer também no período pós-eruptivo devido à exposição salivar (Alomary, et al., 2012). Deste modo, considera-se normal ter sido detectado neste estudo. O fato de não ter sofrido alterações significativas nas médias entre os dois grupos, significa que é um elemento que não desempenha um papel ativo na remineralização do tecido cariado. Este fenómeno foi corroborado por Matsunaga e colaboradores (2009), citados por Lynch (2011), que realizaram uma análise elementar do Zn em esmalte remineralizado, não havendo um aumento significativo da sua concentração em comparação ao tecido saudável, havendo em contrapartida, altas concentrações de Ca nesse mesmo local de análise. Lynch e colaboradores (2011), citado por Lynch (2011), testaram lesões cáries em condições simuladas de saliva rica em Zn, concluindo que nas zonas de máxima remineralização, as suas concentrações eram muito baixas para serem consideradas relevantes, em comparação também com o Ca. Estes dados corroboram os resultados deste estudo referentes ao Zn, visto que também não houve alterações significativas entre os dois grupos. Fornecem também uma clara perspectiva de que o Zn, apesar de ser capaz de remineralizar a HA, não o efetua de forma tão eficaz com a presença simultânea de elementos mais reativos como o Ca ou até o Sr (Lynch, 2011). Ou seja, estes dois últimos, pelas suas semelhanças e maior propensão à remineralização, conseguem incorporar a HA impedindo a ligação do Zn.

Deste modo, esta investigação permitiu obter dados quanto à composição elementar dos dentes saudáveis proporcionando, assim, uma base de comparação com a estrutura dentária afetada pela condição patológica mais frequente na cavidade oral: a cárie. Isto fornece uma nova perceção desta doença, dando conhecimento das suas características sob uma perspectiva diferente.

No entanto, são reconhecidas limitações a este estudo que podem dever-se a alguns fatores, tais como: o fato de ter sido utilizada a técnica WDXRF, o que faz com que a análise elementar não seja tão rigorosa quando comparada com outras técnicas como, por exemplo, o ICP-MS (Cucina, Dudgeon, & Neff, 2007), devido às diferenças nos limites de deteção com consequente alteração dos resultados; e o fato de se ter

analisado o dente como um todo não nos permite inferir sobre uma possível relação específica entre elementos e tecidos dentários diferentes.

Para estudos futuros, parece pertinente realizar novas investigações no sentido de aprofundar os poucos conhecimentos que existem em relação a esta temática. Um estudo igual a este mas com uma técnica analítica diferente pode ser útil na detecção de novos elementos e, também, na comparação da eficácia das respectivas técnicas. De igual modo, investigar perfis elementares consoante o sexo, idade e etnia permitiria confirmar e aprofundar o conhecimento sobre possíveis alterações sofridas pela HA. Efetuar uma análise elementar de cada um dos tecidos dentários em separado e simultaneamente na presença de cárie, poderia ser outro estudo a abordar. Comparar diferenças elementares nos dentes antes e depois de serem alvos de tratamentos como, por exemplo, branqueamentos dentários, também parece ser um tema de interesse clínico. Por fim, investigar alterações sofridas na estrutura elementar do dente após a aplicação de dentífricos, colutórios, géis e vernizes, pode ajudar a entender o papel exercido pelos elementos nos tecidos dentários.

V – Conclusão

Através da utilização de WDXRF, este estudo identificou a presença de vários elementos químicos como parte integrante da estrutura bioquímica dos tecidos dentários, em condições normais e na presença de cárie. Efetuando uma comparação direta entre as médias desses mesmos elementos, verificou-se que existem diferenças significativas nas suas concentrações entre os dentes saudáveis e dentes cariados. Deste modo, conclui-se que o Ca, o Sr e o Mg desempenham um papel ativo na remineralização depois de se instalar o processo de cárie, devido à sua alta capacidade de ligação química à HA. Por outro lado, o P, o Na e o Cl não apresentam essas características, como demonstrado pela diminuição das suas concentrações nos dentes cariados, causada pela perda da estrutura mineral dos tecidos dentários. Por outro lado, o Zn é um elemento com capacidade de ligação à HA fragilizada pela lesão de cárie, porém, mais reduzida quando comparada à do Ca e à do Sr. Quando presente em baixas concentrações no meio oral e na presença simultânea desses elementos, o Zn não consegue uma ligação à HA tão forte.

De uma forma geral, os objetivos pretendidos com este estudo foram cumpridos, conseguindo detetar diferenças significativas a partir das quais se pôde obter uma nova perspectiva em relação à cárie dentária.

Os estudos elementares dos dentes representam um tema atual na comunidade científica e na medicina dentária, proporcionando válidas informações com amplas implicações a nível clínico. Porém, existe a necessidade de continuar a efetuar estudos como este com o intuito de aprofundar e consolidar os conhecimentos atuais.

Por fim, conclui-se que a análise de perfis elementares nos dentes e a sua interação, é importante tanto do ponto de vista bioquímico como clínico, devido às muitas implicações que se podem obter.

VI – Implicações Clínicas

Neste capítulo tenciona-se relacionar os resultados deste estudo, que fornecem um conhecimento acrescido sobre a constituição elementar da estrutura dentária, com diferentes tratamentos e intervenções no âmbito da prevenção e tratamento em várias vertentes da medicina dentária.

Os elementos estão relacionados com o desenvolvimento da cárie e com a sua prevenção (Hare, et al., 2011). Por exemplo, em relação ao Fe, acredita-se que possa ter um papel de interesse na redução da sua incidência (Al-Shalan, 2009), devido em grande parte à sua associação com enzimas cariostáticas como a peroxidase (Watanabe, et al., 2011). Este papel é reforçado por Devulapalle & Mooser (2001) citados por Al-Shalan (2009), que afirmam que este elemento pode exercer uma forte inibição também sobre a glucotransferase, enzima responsável pela mediação de ligações glicosídicas que levam à formação de hidratos de carbono. Ao inibir a formação de hidratos de carbono, impede que estes sejam utilizados por bactérias cariogénicas, como a *Streptococcus Mutans*, impedindo assim os seus efeitos nefastos sobre o dente, evitando o desenvolvimento de lesões de cárie. Este mecanismo de defesa, providenciado pelo Fe, é defendido por Berlutti e colaboradores (2004) citado por Al-Shalan (2009).

O estudo *in vitro* de Al-Shalan (2009) comprovou que existem suplementos de Fe que podem desempenhar um papel cariostático. Isto ocorre porque é um elemento que adere à parte orgânica do esmalte, com capacidade de criar uma camada protetora, evitando assim a sua dissolução ácida. Este conjunto de conceitos é de especial interesse visto que se trata de um elemento presente na estrutura do dente, tal como se verifica no presente estudo. Portanto, é um elemento com elevada utilidade em relação à criação de métodos de prevenção da cárie baseada em produtos compostos pelo mesmo.

Relativamente à prevenção da cárie existe grande interesse em relação ao Sr. É um elemento muito importante, como descrito ao longo deste trabalho. Tem sido referido como um possível agente cariostático (Koletsi-Kounari, Mamai-Homata, & Diamanti, 2012) existindo inclusivamente evidência científica que suporta a existência de uma possível concentração ótima de Sr na água (5-6 mg/L), que permite a redução da incidência da cárie (Enomoto, et al., 2012). Este conceito é defendido pelo fato do Sr exercer um efeito cariostático quando presente em altas concentrações no meio oral (Koletsi-Kounari, et al., 2012). Porém, ainda existe a necessidade da execução de mais

estudos epidemiológicos para se poder confirmar este fenómeno (Lippert & Hara, 2013).

Em relação à interação do Sr com os tecidos dentários, sabe-se que é acentuada pelas suas características similares às do Ca, nomeadamente, o raio iónico (Lippert & Hara, 2013). O presente estudo prova a tendência que este elemento tem para incorporar a HA quando se encontra desmineralizada na presença de lesões cariosas. Acredita-se que este fenómeno ocorre para contrariar esse efeito remineralizando e reforçando a estrutura dentária remanescente (Li, et al., 2013) e aumentando a sua dureza e a sua resistência aos ácidos bacterianos (Enomoto, et al., 2012). Este efeito é defendido pelo estudo de Riyat & Sharma (2009a), que concluiu que o Sr é benéfico na redução da perda de Ca na estrutura de dentes saudáveis e cariados. Assim, o Sr não só remineraliza a HA, como evita a perda de iões de Ca.

Desta forma, é natural que se pense em produzir produtos de higiene oral com base neste elemento. Zero e colaboradores (1982), citados por Lippert & Hara (2013), estudaram a eficácia de pastas dentífricas de Sr, comprovando que a sua utilização aumenta a concentração deste elemento no esmalte e, consequentemente, reforça-o. Posteriormente, Koletsi-Kounari e colaboradores (2012), corroboraram este fenómeno, ao provar que a aplicação no esmalte de um produto à base de Sr, promove a remineralização e reduz a dissolução ácida nesse tecido.

Existe também a possibilidade de associar estes processos implicados na cárie para outras patologias com particular interesse clínico como a hipersensibilidade dentária.

A hipersensibilidade dentária é definida como uma dor aguda causada pela exposição de dentina, tipicamente por resposta a estímulos químicos, térmicos, táteis ou osmóticos (Ananthakrishna, Raghu, Koshy, & Kumar, 2012). É uma condição dolorosa sentida por milhões de pessoas em todo o mundo (West, et al., 2013), com incidência até 74% entre os 30 e os 50 anos de idade (Ananthakrishna, et al., 2012).

Portanto, esta é uma patologia com amplo interesse clínico, suscitando variadas opções de tratamento, como os dentífricos à base de diferentes compostos, dos quais se destacam o Sr e o Ca.

O Sr é um elemento utilizado em pastas dentífricas há mais de 40 anos, pois acredita-se nas suas características preventivas em relação à cárie dentária, como anteriormente descrito, mas também em relação à hipersensibilidade. Uma revisão literária sobre a eficácia de pastas de Sr e outras de K, realizada por Karim & Gillam

(2013), revela que ambas apresentam capacidade de redução da sintomatologia. Destaca-se também o estudo de Ananthakrishna e colaboradores (2012) que compara a eficácia de uma pasta contendo cloreto de Sr e outra contendo um material de vidro bioativo composto por Ca, Na e P. No primeiro caso existe uma redução em mais de 50% da sintomatologia após a sua utilização durante 6 semanas e, no segundo, há redução até 90% com o mesmo tempo de atuação. Estes e outros autores por eles citados defendem a ideia da utilização de pastas dentífricas à base de Sr para o tratamento da hipersensibilidade dentária, assim como a utilização de pastas constituídas por Ca, Na e P.

Este efeito reparador deve-se à formação de uma camada protetora no interior dos túbulos dentinários, devido à substituição do íon de Sr pelo íon de Ca, criando assim uma HA mais densa e mais resistente (West, et al., 2013). Os resultados no caso de produtos com Ca, Na e P, devem-se a uma série de reações que ocorrem devido à interação destes elementos, levando ao aumento de pH que, consequentemente, auxilia na precipitação de íons de fosfato e Ca provenientes da pasta e também da saliva, o que se traduz na obliteração dos túbulos dentinários (Ananthakrishna, et al., 2012).

Estes processos descritos anteriormente vão de encontro aos resultados deste estudo visto que o Sr e o Ca são elementos quimicamente muito semelhantes e, portanto, apresentam comportamentos também similares, com a particularidade do Sr ser um íon mais reativo em comparação ao Ca, podendo assim ocorrer a substituição mútua entre eles na matriz dos tecidos dentários. Além do Sr e do Ca, os outros elementos inseridos nestes produtos são constituintes naturais da HA dentária e, sendo utilizados no tratamento e prevenção de condições patológicas relativas à cavidade oral, pode-se deduzir que, para reparar a estrutura dentária danificada ou perdida, os produtos quimicamente semelhantes à condição natural do dente, são uma opção viável e fiável.

A dentisteria operatória tem como objetivo restaurar dentes cariados, reabilitando a forma, a função e a estética originais. Um componente importante na dentisteria são os sistemas adesivos e a sua interação com o tecido dentário onde vai aderir. Nesse sentido é importante conhecer uma possível influência dos elementos presentes nesses tecidos na adesão dos materiais restauradores.

Considerando que os sistemas adesivos self-etch desmineralizam apenas parcialmente a dentina, existe a possibilidade da HA residual servir como local de interações químicas entre os monómeros e os componentes elementares deste tecido (Nunes, Polido, Amorim, Nunes, & Toledano, 2007). As características minerais da

matriz da dentina podem influenciar a força da ligação do adesivo em sistemas self-etch (Nakajima, Kitasako, Okuda, Foxton, & Tagami, 2005). O primer ácido contido nestes sistemas interage com o Ca e forma íons insolúveis (Nakajima, et al., 2005). O mesmo autor defende ainda que, a presença de Ca na zona desmineralizada da matriz dentinária, pode promover ligações químicas com os monómeros do sistema adesivo. Este fenómeno é defendido por Nunes e colaboradores (2007), que provaram a presença de ligações iónicas entre o Ca presente na HA e íons fosfato presente no monómero do adesivo.

Finalmente, outro tipo de intervenção muito importante na medicina dentária atualmente, centra-se no tratamento de defeitos ósseos utilizando enxertos. Existem quatro tipos diferentes de enxertos: autógenos (retirados do próprio organismo), alógenos (dadores da mesma espécie), aloplástico (de origem sintética) e xenógenos (dadores de espécie diferente) (Kim, et al., 2013). O tipo de enxerto atualmente considerado *gold-standard* é o osso autógeno devido à sua capacidade osteoindutora, osteocondutora e osteogénica, sem resposta imunológica e patológica, apesar de apresentar desvantagens como o local da colheita (Binderman, Hallel, Nardy, Yaffe, & Sapoznikov, 2014). Porém, o dente autógeno tem vindo a suscitar interesse como substituto do osso, apresentando também capacidades osteoindutoras e osteocondutoras (Murata, et al., 2011). O primeiro relato da sua utilização como material de enxerto autógeno foi em 2003, em que Murata realizou uma elevação do seio maxilar (Murata, et al., 2013).

Os dentes, e o osso alveolar dos maxilares e da mandíbula desenvolvem-se a partir de células da crista neural e, por isso, apresentam muitas semelhanças, nomeadamente, em relação à composição química (Kim, et al., 2013). O osso alveolar é composto por 65% de matéria inorgânica e 35% de matéria orgânica, ou seja, aproximadamente os valores dos tecidos dentários, mais precisamente, os da dentina (Murata, et al., 2013). As suas características osteocondutoras devem-se à estrutura mineral da HA que, com o seu alto teor em Ca e P, formam uma estrutura altamente cristalina e semelhante à do osso. Este conceito foi defendido por Kim e colegas (2010), que demonstraram a presença desses mesmos componentes num material de enxerto criado a partir de tecidos dentários reduzidos a pó. Em alternativa, as suas características osteoindutoras estão relacionadas a proteínas morfogénicas do osso, fatores de crescimento e de diferenciação presentes na matriz da dentina desmineralizada e que podem estimular a regeneração óssea (Murata, et al., 2013). Binderman e colaboradores

(2014), postulam que, apesar da dentina desmineralizada conter esses fatores osteoindutores, o osso formado a partir deste enxerto não é forte o suficiente para suportar, por exemplo, implantes dentários. Por isso, em contrapartida, Binderman e colegas (2014) defendem o protocolo por eles desenvolvido, em que utilizam o dente como um todo, aproveitando os tecidos mineralizados, que permitem a manutenção da estabilidade do enxerto e a criação de um local com boa capacidade para receber implantes. Por estes motivos, os dentes com indicação de extração, podem servir como enxerto autógeno, utilizando os seus componentes inorgânicos e orgânicos, juntando assim, as boas qualidades osteocondutoras e osteoindutoras (Kim, et al., 2013).

Finalizando, o conjunto de estudos enunciados neste capítulo, salienta a importância da pesquisa de perfis elementares nos tecidos dentários, porque a existência de interações entre estes e os materiais utilizados em medicina dentária, é um tema atual de grande interesse.

VII – Bibliografia

- Alomary, A., Al-Momani, I. F., Obeidat, S. M., & Massadeh, A. M. (2012). Levels of lead, cadmium, copper, iron, and zinc in deciduous teeth of children living in Irbid, Jordan by ICP-OES: some factors affecting their concentrations. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(4), 3283–3295.
- Al-Shalan, T. A. (2009). In vitro cariostatic effects of various iron supplements on the initiation of dental caries. *Saudi Dental Journal*, 21(3), 117–122.
- Amr, M. A., & Helal, A. F. I. (2010). Analysis of trace elements in teeth by ICP-MS: implications for caries. *Journal of Physical Science*, 21(2), 1–12.
- Amtmann, A., & Armengaud, P. (2009). Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 275–283.
- Ananthakrishna, S., Raghu, T. N., Koshy, S., & Kumar, N. (2012). Clinical evaluation of the efficacy of bioactive glass and strontium chloride for treatment of dentinal hypersensitivity. *Journal of Interdisciplinary Dentistry*, 2(2), 92–97.
- Anderson, M. (2002). Risk assessment and epidemiology of dental caries: review of the literature. *Pediatric Dentistry*, 24(5), 377–385.
- Anjos, M. J., Barroso, R. C., Pérez, C. A., Braz, D., Moreira, S., Dias, K. R. H. C., & Lopes, R. T. (2004). Elemental mapping of teeth using μ SRXRF. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 213, 569–573.
- Areias, C., Macho, V., Raggio, D., Melo, P., Guimarães, H., Andrade, C. D., & Pinto, G. (2010). Cárie precoce da infância-o estado da arte. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 41(5), 217–221.
- Arora, M., Kennedy, B. J., Elhlou, S., Pearson, N. J., Walker, D. M., Bayl, P., & Chan, S. W. Y. (2006). Spatial distribution of lead in human primary teeth as a biomarker of pre- and neonatal lead exposure. *Science of the Total Environment*, 371(1-3), 55–62.
- Arora, M., Hare, D., Austin, C., Smith, D. R., & Doble, P. (2011). Spatial distribution of manganese in enamel and coronal dentine of human primary teeth. *The Science of the Total Environment*, 409(7), 1315–9.
- Barton, H. J. (2011). Advantages of the use of deciduous teeth, hair, and blood analysis for lead and cadmium bio-monitoring in children. A study of 6-year-old children from Krakow (Poland). *Biological Trace Element Research*, 143(2), 637–658.
- Binderman, I., Hallel, G., Nardy, C., Yaffe, A., & Sapoznikov, L. (2014). A Novel Procedure to Process Extracted Teeth for Immediate Grafting of Autogenous Dentin. *Interdisciplinary Medicine and Dental Science*, 2(6), 2–6.

- Bravo-Pérez, M., Frias-Bulhosa, J., Casals-Peidró, E., Duarte, F., Rueda-García, J., Liqueste-Otero, M., ... Scapini, C. (2014). Proposta de estratégias e medidas em Espanha e Portugal para a prevenção e tratamento não invasivo da cárie em clínica dentária. *Journal of the American Dental Association*, 14(2), 22–26.
- Brown, C. J., Chenery, S. R. N., Smith, B., Mason, C., Tomkins, A., Roberts, G. J., Serunjogi, L., & Tiberindwa, J. V. (2004). Environmental influences on the trace element content of teeth--implications for disease and nutritional status. *Archives of Oral Biology*, 49(9), 705–17.
- Cangussu, M. C. T., & Lopes, L. S. (2012). Epidemiologia da cárie dentária no estado da Bahia de 1986 a 2012. *Revista Baiana de Saúde Pública*, 36(3), 640–650.
- Carvalho, M. L., Brito, J., & Barreiros, M. A. (1998). Study of trace element concentrations in human tissues by EDXRF spectrometry. *X-Ray Spectrometry*, 27(3), 198–204.
- Carvalho, M. L., Casaca, C., Marques, J. P., Pinheiro, T., & Cunha, A. S. (2001). Human teeth elemental profiles measured by synchrotron x-ray fluorescence: dietary habits and environmental influence. *X-Ray Spectrometry*, 30(3), 190–193.
- Castro, W., Hoogewerff, J., Latkoczy, C., & Almirall, J. R. (2010). Application of laser ablation (LA-ICP-SF-MS) for the elemental analysis of bone and teeth samples for discrimination purposes. *Forensic Science International*, 195(1-3), 17–27.
- Chasapis, C. T., Loutsidou, A. C., Spiliopoulou, C. A., & Stefanidou, M. E. (2011). Zinc and human health: an update. *Archives of Toxicology*, 86(4), 521–534.
- Costa, S., Adelário, A., Vasconcelos, M., & Abreu, M. (2012). Modelos explicativos da cárie dentária: do organicista ao ecossistêmico. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 12(2), 285–291.
- Cucina, A., Dudgeon, J., & Neff, H. (2007). Methodological strategy for the analysis of human dental enamel by LA-ICP-MS. *Journal of Archaeological Science*, 34(11), 1884–1888.
- Daglia, M., Papetti, A., Mascherpa, D., Grisoli, P., Giusto, G., Lingström, P., Pratten, J., Signoretto, C., Spratt, D., Wilson, M., Zaura, E., & Gazzani, G. (2011). Plant and fungal food components with potential activity on the development of microbial oral diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–9.
- Enomoto, A., Tanaka, T., Kawagishi, S., Nakashima, H., Watanabe, K., & Maki, K. (2012). Amounts of Sr and Ca eluted from deciduous enamel to artificial saliva related to dental caries. *Biological Trace Element Research*, 148(2), 170–177.
- Fischer, A., Wiechula, D., Postek-Stefańska, L., & Kwapuliński, J. (2009). Concentrations of metals in maxilla and mandible deciduous and permanent human teeth. *Biological Trace Element Research*, 132(1-3), 19–26.

- Fischer, A., Wiechula, D., & Przybyla-Misztela, C. (2013). Changes of concentrations of elements in deciduous teeth with age. *Biological Trace Element Research*, 154(3), 427–432.
- Galvão, J., Proença, L., & Barroso, H. (2012). Prevalência da cárie dentária e presença de bactérias cariogénicas no dorso lingual - Estudo seccional cruzado. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentaria e Cirurgia Maxilofacial*, 53(1), 11–16.
- Geraldo-Martins, V. R., & Marques, M. (2009). Aspectos microbiológicos, histopatológicos e clínicos da cárie radicular. *Journal of Health Sciences*, 27(1), 67–72.
- Ghadimi, E., Eimar, H., Marelli, B., Nazhat, S. N., Asgharian, M., Vali, H., & Tamimi, F. (2013). Trace elements can influence the physical properties of tooth enamel. *SpringerPlus*, 2(1), 499.
- Gierat-Kucharzewska, B., Braziewicz, J., Majewska, U., Gózd, S., & Karasinski, A. (2003). Concentration of selected elements in the roots and crowns of both primary and permanent teeth with caries disease. *Biological Trace Element Research*, 96(1-3), 159–167.
- Gomes, V. E., Sousa, M. D. L. R. De, Barbosa, F., Krug, F. J., Saraiva, M. D. C. P., Cury, J. A., & Gerlach, R. F. (2004). In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Science of the Total Environment*, 320(1), 25–35.
- Hanć, A., Olszewska, A., & Baralkiewicz, D. (2013). Quantitative analysis of elements migration in human teeth with and without filling using LA-ICP-MS. *Microchemical Journal*, 110, 61–69.
- Hare, D., Austin, C., Doble, P., & Arora, M. (2011). Elemental bio-imaging of trace elements in teeth using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Dentistry*, 39(5), 397–403.
- Kamberi, B., Kqiku, L., Hoxha, V., & Dragusha, E. (2011). Lead concentrations in teeth from people living in Kosovo and Austria. *Collegium Antropologicum*, 35(1), 79–82.
- Kamenov, G. D., & Gulson, B. L. (2014). The Pb isotopic record of historical to modern human lead exposure. *Science of the Total Environment*, 490, 861–870.
- Karim, B. F. A., & Gillam, D. G. (2013). The efficacy of strontium and potassium toothpastes in treating dentine hypersensitivity: a systematic review. *International Journal of Dentistry*, 2013(4), 1-13.
- Kim, Y.-K., Lee, J., Um, I.-W., Kim, K.-W., Murata, M., Akazawa, T., & Mitsugi, M. (2013). Tooth-derived bone graft material. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 39(3), 103–111.

- Kohn, M. J., Morris, J., & Olin, P. (2013). Trace element concentrations in teeth – a modern Idaho baseline with implications for archeometry, forensics, and palaeontology. *Journal of Archaeological Science*, 40(4), 1689–1699.
- Koletsis-Kounari, H., Mamai-Homata, E., & Diamanti, I. (2012). An in vitro study of the effect of aluminum and the combined effect of strontium, aluminum, and fluoride elements on early enamel carious lesions. *Biological Trace Element Research*, 147(1-3), 418–427.
- Kumagai, A., Fujita, Y., Endo, S., & Itai, K. (2012). Concentrations of trace element in human dentin by sex and age. *Forensic Science International*, 219(1-3), 29–32.
- Li, Z., He, M., Peng, B., & Jin, Z. (2013). Strontium concentrations and isotope ratios in enamel of healthy and carious teeth in southern Shaanxi, China. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(17), 1919–1924.
- Lima, J. E. D. O. (2007). Cárie dentária: um novo conceito. *Revista Dental Press de Ortodontia E Ortopedia Facial*, 12(6), 119–130.
- Lippert, F., & Hara, A. T. (2013). Strontium and caries: a long and complicated relationship. *Caries Research*, 47(1), 34–49.
- Lynch, R. J. M. (2011). Zinc in the mouth, its interactions with dental enamel and possible effects on caries: a review of the literature. *International Dental Journal*, 61(3), 46–54.
- Markowitz, K. (2013). A new treatment alternative for sensitive teeth: a desensitizing oral rinse. *Journal of Dentistry*, 41(1), S1–S11.
- Martins, R. S., Macêdo, J. B., Muniz, F. W. M. G., Carvalho, R. S., & Moreira, M. M. S. M. (2011). Composição, princípios ativos e indicações clínicas dos dentifrícios: uma revisão da literatura entre 1989 e 2011. *Journal of Health Sciences*, 30(3), 287–291.
- Mlakar, N., Pavlica, Z., Petelin, M., Štrancar, J., Zrimšek, P., & Pavlič, A. (2014). Animal and human dentin microstructure and elemental composition. *Central European Journal of Medicine*, 9(3), 468–476.
- Murata, M., Akazawa, T., Mitsugi, M., Um, I.-W., Kim, K.-W., & Kim, Y.-K. (2011). Human dentin as novel biomaterial for bone regeneration. In R. Pignatello, *Biomaterials-physics and chemistry* (pp. 127-140). InTech.
- Murata, M., Akazawa, T., Mitsugi, M., Kabir, A., Um, I.-W., Minamida, Y., Kim, K.-W., Kim, Y.-K., Sun, Y., & Qin, C. (2013). Autograft of dentin materials for bone regeneration. In R. Pignatello, *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications* (pp. 225-238). InTech.
- Nakajima, M., Kitasako, Y., Okuda, M., Foxton, R. M., & Tagami, J. (2005). Elemental distributions and microtensile bond strength of the adhesive interface to normal

- and caries-affected dentin. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 72(2), 268–275.
- Nunes, T. G., Polido, M., Amorim, A., Nunes, S. G., & Toledano, M. (2007). Multinuclear magnetic resonance studies on the chemical interaction of a self-etching adhesive with radicular and coronal human dentin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(10), 2093–2099.
- Oprea, C., Szalanski, P. J., Gustova, M. V., Oprea, I. A., & Buzguta, V. (2009). Multivariate comparison of elemental concentrations in human teeth. *Applied Radiation and Isotopes*, 67(12), 2142–2145.
- Peedikayil, F. C., Kumar, S. V., & Thangavelu, M. (2013). Estimation of trace elements in sound and carious enamel of primary teeth by atomic emission spectrometry. *Health Sciences*, 2(1), 1–12.
- Petersen, P. E., & Lennon, M. A. (2004). Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 32(5), 319–321.
- Reynard, B., & Balter, V. (2014). Trace elements and their isotopes in bones and teeth: diet, environments, diagenesis, and dating of archeological and paleontological samples. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 416, 4–16.
- Riyat, M., & Sharma, D. C. (2009a). An experimental study of the effect of strontium pre-treatment on calcium release from carious and non-carious teeth. *Biological Trace Element Research*, 133(3), 251–254.
- Riyat, M., & Sharma, D. C. (2009b). Analysis of 35 inorganic elements in teeth in relation to caries formation. *Biological Trace Element Research*, 129(3), 126–129.
- Riyat, M., & Sharma, D. C. (2010). Significance of trace element profile of blood of persons with multiple caries versus sound teeth. *Biological Trace Element Research*, 134(2), 174–179.
- Rošin-Grget, K., Peroš, K., Sutej, I., & Bašić, K. (2013). The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Medica Academica*, 42(2), 179–88.
- Santos, E. S., Gama, E. M., França, R. S., Souza, A. S., & Matos, R. P. (2013). Espectrometria de fluorescência de raios-X na determinação de espécies químicas. In *Enciclopédia Biosfera*.
- Shashikiran, N. D., Reddy, V. V. S., & Hiremath, M. C. (2007). Estimation of trace elements in sound and carious enamel of primary and permanent teeth by atomic absorption spectrophotometry: an in vitro study. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 18(4), 157–162.
- Silva, J. B. O. R. (2009). Cárie dentária : uma doença transmissível e reversível, 31(1), 26–33.

- Sizer, F. S., & Whitney, E. N. (2013). Water and Minerals. In F. S. Sizer, & E. N. Whitney, *Nutrition: concepts and controversies* (pp. 302-321). Wadsworth: Cengage Learning.
- Souza-Guerra, C., Barroso, R. C., Almeida, A. P., Peixoto, I. T. A., Moreira, S., Sousa, F. B., & Gerlach, R. F. (2014). Anatomical variations in primary teeth microelements with known differences in lead content by micro-Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence (μ -SRXRF) – A preliminary study. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(2), 186–193.
- Tanaka, T., Maki, K., Hayashida, Y., & Kimura, M. (2004). Aluminum concentrations in human deciduous enamel and dentin related to dental caries. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 18(2), 149–54.
- Teruel, J. D. D., Alcolea, A., Hernández, A., & Ruiz, A. J. O. (2015). Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of Oral Biology*, 60(5), 768–775.
- Waidyasekera, P. G. K., Nikaido, T., Weerasinghe, D. D. S., Wettasinghe, K. A., & Tagami, J. (2007). Caries susceptibility of human fluorosed enamel and dentine. *Journal of Dentistry*, 35(4), 343–349.
- Watanabe, K., Tanaka, T., Shigemi, T., Hayashida, Y., & Maki, K. (2009). Mn and Cu concentrations in mixed saliva of elementary school children in relation to sex, age, and dental caries. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23(2), 93–99.
- Watanabe, K., Tanaka, T., Shigemi, T., Saeki, K., Fujita, Y., Morikawa, K., Nakashima, H., Takahashi, S., Watanabe, S., & Maki, K. (2012). Al and Fe levels in mixed saliva of children related to elution behavior from teeth and restorations. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25(3), 143–148.
- West, N., Newcombe, R. G., Hughes, N., Mason, S., Maggio, B., Sufi, F., & Claydon, N. (2013). A 3-day randomised clinical study investigating the efficacy of two toothpastes, designed to occlude dentine tubules, for the treatment of dentine hypersensitivity. *Journal of Dentistry*, 41(2), 187–194.
- Williams, A.-M. M., & Siegele, R. (2014). Iron deposition in modern and archaeological teeth. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 335, 19–23.
- Zaichick, V. (2009). Neutron activation analysis of Ca, Cl, K, Mg, Mn, Na, P, and Sr contents in the crowns of human permanent teeth. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 281(1), 41–45.